



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO

**Aislamiento y adaptación de microorganismos acidófilos nativos del
yacimiento minero San Vicente ubicado en la provincia de Zamora
Chinchipec para su aplicación en la biooxidación**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: González Lapo, Gabriela Alejandra

DIRECTORA: Aguirre Chamba, Paulina Isabel, Ing.

LOJA-ECUADOR

2016



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2016

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ingeniera.

Paulina Isabel Aguirre Chamba

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación Aislamiento y adaptación de microorganismos acidófilos nativos del yacimiento minero San Vicente ubicado en la provincia de Zamora Chinchipe para su aplicación en la biooxidación, realizado por González Lapo Gabriela Alejandra ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, 03 de Febrero del 2016

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Gabriela Alejandra González Lapo declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: **Aislamiento y Adaptación de microorganismos acidófilos nativos del yacimiento minero San Vicente ubicado en la provincia de Zamora Chinchipe para su aplicación en la Biooxidación**, de la titulación de Ingeniería Química, siendo Paulina Isabel Aguirre Chamba director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 68 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.

Autor: González Lapo Gabriela Alejandra

1900478965

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado primeramente al forjador de mi camino mi padre celestial por haber bendecido mi vida. A las personas que más amo mi familia, en especial a mis padres Lili y Santos que con sus consejos, amor, apoyo y esfuerzo he podido culminar esta etapa de mi vida.

Gabriela González

AGRADECIMIENTO

El agradecimiento más sincero a Dios, por haberme dado la sabiduría necesaria para culminar con éxito este trabajo.

A mis queridos padres, Santos y Lili, que han sabido formarme con buenos sentimientos, cariño, hábitos y valores, gracias por apoyarme incondicionalmente en alcanzar esta meta importante en mi vida.

A mis hermanos, Liliana y Ever, por el apoyo que me brindaron día tras día en el transcurso de mi carrera universitaria.

A mi gran amiga de Tesis, Ingeniera Paulina Aguirre quien me ha impartido sus conocimientos, experiencias y paciencia. Gracias al gran apoyo brindado en la realización de este trabajo investigativo, por confiar en mí y darme esta gran oportunidad de realizar este trabajo.

A mi tribunal, Ing. Víctor Sanmartín y Mgs. Diego Nieto que también han sido parte fundamental para alcanzar esta meta, gracias por guiarme y estar siempre pendientes de este trabajo.

A mis queridas amigas Kattyta y Karito que de una u otra manera siempre me apoyaron, gracias por compartir conmigo gratos momentos durante toda la universidad. Más que amigas son mis hermanas.

A Edison por estar a mi lado en las buenas y en las malas, gracias por tu paciencia y amor, porque siempre estuviste dándome ánimos para seguir adelante.

Este trabajo va dedicado a mi único ángel Danilo Ortiz Lapo gracia ñaño a ti, porque siempre quisiste lo mejor en mi vida y me apoyaste cuando más necesite, sé que has estado siempre cuidándome y guiándome desde el cielo. Recuerda que aunque ya no te pueda abrazar, aún estás conmigo y siempre vivirás en mi corazón.

A todas esas personas que supieron brindarme su apoyo en la realización de esta tesis.

Gabriela González

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I- MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Ubicación del yacimiento minero San Vicente.....	6
1.2. Biooxidación de sulfuros	6
1.3. Bacterias usadas en el proceso de biooxidación.....	6
1.3.1. <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	6
1.3.2. <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	7
1.3.3. Mecanismos de biooxidación bacteriana.	7
1.3.4. Cinética de crecimiento bacteriano.	9
1.4. Proceso de biooxidación en tanques agitados	9
1.4.1. Biooxidación en un sistema por lotes.....	10
1.4.2. Factores que intervienen en el proceso de biooxidación.....	10
1.5. Objetivos.....	14
CAPÍTULO II- METODOLOGÍA.....	15
2.1. Lugar de muestreo.....	16
2.1.1. Muestras para aislamiento de microorganismos.....	16
2.1.2. Muestra para proceso de biooxidación.	16
2.2. Aislamiento del consorcio microbiano	16
2.2.1. Diseño experimental	16
2.2.2. Aislamiento y adaptación de microorganismos en medios específicos.....	17
2.2.3. Caracterización morfológica del consorcio microbiano	18
2.5. Molienda del mineral y análisis granulométrico	19

2.6. Acidificación y adaptación de microorganismos a mineral.....	19
2.7. Biooxidación por lote.....	20
2.7.1.Diseño experimental	20
2.7.2.Descripción y ajuste de reactores para el sistema por lotes.....	20
2.7.3.Microorganismos.	21
2.8. Indicadores indirectos del crecimiento microbiano	21
2.8.1.Determinación de ion ferroso, hierro total e ion férrico	21
2.8.2.Determinación de ion sulfato.....	22
2.8.3.Determinación del número de células.	22
2.8.4.Determinación de pH y Eh (potencial Redox).	22
2.9. Cianuración.....	22
2.10 Determinación de oro.....	22
CAPÍTULO III- RESULTADOS Y ANÁLISIS	23
3.1. Prospección y aislamiento de microorganismos a partir de aguas ácidas, lodos y sedimentos	24
3.1.2. Aislamiento de microorganismos.....	24
3.1.3.Determinación de las cinéticas de crecimiento microbiano en medio 9K.	28
3.1.4.Lixiviación de ión ferroso (Fe^{2+}) y hierro total.	29
3.1.5.Análisis de pH y potencial de óxido reducción (Eh).....	30
3.1.6.Caracterización morfológica de la Muestra 5	31
3.2. Biooxidación en un sistema por lote.....	33
3.2.2.Cinética de crecimiento microbiano.	34
3.2.3.Evaluación del proceso de biooxidación en reactor de tanque agitado.	37
3.2.4.Productividad volumétrica de ion férrico y sulfatos.....	39
3.2.5.Análisis estadístico para las diferentes densidades de pulpa.....	40
3.2.6.Análisis del pH y potencial redox (Eh).....	43
3.2.7.Cianuración del mineral biooxidado.	45
3.2.8.Balance metalúrgico y rendimiento de oro.	46
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXOS.....	54

RESUMEN

Una alternativa de pre-tratamiento para la recuperación de oro es la biooxidación. Motivo por el cual el objetivo de esta investigación fue aislar microorganismos acidófilos nativos de drenajes ácidos naturales y probar su adaptación en un mineral refractario.

Se aisló microorganismos a diferente pH y temperatura. El consorcio aislado fue empleado en el proceso de biooxidación, este se llevó a cabo en un sistema por lote; se mantuvo constante: velocidad de agitación, altura de rotor, temperatura, flujo de aire y tamaño de partícula; se varió la densidad de pulpa (5, 10, 15 y 20 % p/v). Se determinó la concentración de Fe^{2+} , Fe total, sulfatos y conteo bacteriano.

Las condiciones óptimas de crecimiento del consorcio fueron: pH 1.8 y 20°C, con un crecimiento máximo de $3.5 (10)^7$ #bac/mL. Por otro lado, en el sistema por lote se obtuvo productividades volumétricas de $Q_p \text{Fe}^{3+}$ de 2.20, 1.65, 0.80, 0.78 g/L día, $Q_p \text{SO}_4^{2-}$ 3.17, 2.27, 2.10, 1.73 g/L día y una recuperación de oro del 51, 40, 33, 43% para densidades de pulpa de 5, 10, 15 y 20% (p/v), respectivamente.

Palabras clave: biooxidación, microorganismo acidófilos, recuperación de oro, relaves refractarios.

ABSTRACT

An alternative pretreatment for gold recovery is the biooxidation. Why the objective of this research was to isolate native acidophile natural acid drainage and try to adapt a refractory ore characteristics.

During isolation and adaptation of microorganisms bioassays were conducted at different pH (3.4 and 1.8) and temperature (20 and 30 ° C).The consortium was isolated previously used in the bio-oxidation process, it is carried out on a batch system; remained constant: speed of agitation (400rpm), rotor height (3.5 cm), temperature (20 ° C), air flow (3vvm), pH (1.8) ore size (-200 mesh), while evaluated the effect of pulp density (5, 10, 15 and 20% w/v). In isolation and biooxidation process to determine the concentration of Fe^{2+} ; Total Fe, sulfates and bacterial counts.

The results showed that the insulation optimal growth conditions were pH 1.8 and 20 ° C, with a maximum increase of $3.5(10)^7$ #bac/mL. Furthermore, in the system for batch volumetric productivities of $Q_p Fe^{3+}$ of 2.20, 1.65, 0.80, 0.78 g/L day, $Q_p SO_4^{2-}$ 3.17, 2.27, 2.10, 1.73 g/L day and a gold recovery of 51 it was obtained , 40, 33, 43% pulp densities of 5, 10, 15 and 20% (w/v), respectively.

Keywords: Bioleaching, acidophilus microorganisms, gold recovery, refractory tailings.

INTRODUCCIÓN

Se estima que la producción total de oro a nivel mundial proviene de minerales refractarios los cuales van en crecimiento. Una alternativa de pre-tratamiento para la recuperación de este metal es la biooxidación.

Este proceso oxidativo se ha efectuado en reactores de tanque agitado para dar tratamiento a relaves obtenidos de menas refractarias, el cual logra que las partículas de oro ocluidas en la matriz de un mineral sulfurado sean fáciles a la cianuración (González, 1999; González *et. al.*, 2003). Se lo utiliza como una alternativa a los procesos tradicionales como oxidación química, tostación y oxidación a presión (Akcil, 2004; Ospina *et. al.*, 2012).

Las bacterias acidófilas participantes en la biooxidación son *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* que poseen la habilidad para acelerar la disolución oxidativa de minerales sulfurosos presentes en relaves de minas (Colmer *et. al.*, 1950; Argelia, 2004) y son importantes para la extracción de metales preciosos (Harneit *et. al.*, 2006). Durante el proceso biooxidativo los microorganismos oxidan y disuelven los sulfuros a través de mecanismos de acción directa e indirecta utilizando como fuente de energía las especies reducidas de hierro y azufre, y como fuente de carbono el CO₂ (González, 2004; Arroyave, 2008).

Por otro lado, las reservas de metales preciosos de la región sur oriental de la provincia de Zamora Chinchipe están asociadas a sulfuros, sulfatos y óxidos. En esta provincia se emprenden proyectos de investigación que cuantifican hasta la fecha reservas alrededor de 20 millones de onzas de oro, 40 millones de onzas de plata, 30 mil millones de libras de cobre, por lo que se observa el eventual desarrollo de minería a pequeña, mediana y gran escala (Paladines, 1989). Se cree que en el yacimiento minero San Vicente de Zamora Chinchipe se producen relaves, en cuyo contenido hay oro refractario ocluido en forma de pirita (FeS), caolinita Al₂ (Si₂O₅) (OH)₄, muscovita KAl₂ (AlSi₃O₁₀) (OH)₂ y arsenopirita (FeAsS), debido a esto, se requiere dar tratamiento al relave, para permitir destruir la matriz de sulfuro en la que se encuentra insertado el oro (Marsden y House, 1992).

Por tal motivo en el capítulo 1 que corresponde al marco teórico se describen las bases teóricas para la comprensión del proceso que se utilizó en esta investigación, también se indica el tipo de bacterias acidófilas que intervienen y los mecanismos de acción, a la par es

importante conocer que factores físicos y químicos se deben considerar antes y durante la biooxidación, ya que son herramientas importantes para un buen crecimiento microbiano y buena solubilización del mineral refractario.

En el capítulo 2 se detalla la metodología empleada en esta investigación, la zona de muestreo, el diseño experimental que se utilizó, y técnicas de control que se llevaron a cabo en el aislamiento y proceso de biooxidación.

El capítulo 3 muestra los resultados alcanzados en este estudio, los métodos estadísticos empleados para el análisis de resultados del aislamiento, así como del proceso de biooxidación. Además se aprecian las cinéticas de crecimiento bacteriano y solubilización del mineral aurífero.

Finalmente se redactaron las conclusiones y recomendaciones obtenidas a partir de los resultados de esta investigación.

Bajo este contexto es importante destacar que la lixiviación bacteriana es un proceso ventajoso para las zonas mineras del Ecuador no solo desde el punto de vista económico, al obtenerse mayores recuperaciones de metales preciosos como el oro, sino también porque ayuda aminorar el impacto sobre el medio ambiente puesto que la oxidación de los sulfuros como la pirita es un proceso monitoreado y controlado (Schippers *et. al.*, 1999). Finalmente de esta forma se pretende aprovechar los recursos naturales del suelo, extrayendo los metales de interés y utilizando los insumos químicos de una manera racional y eficiente, por ende, este proceso se vuelve significativo en la industria minera a pequeña, mediana y gran escala (González, 1999; Jaramillo, 2014).

Los objetivos planteados en este estudio, tuvieron gran alcance puesto que se logró aislar y adaptar microorganismos nativos de la zona de Zamora Chinchipe y se estableció sus condiciones óptimas de crecimiento para posteriormente ser probados en un mineral de características refractarias de la misma zona. Durante estos bioensayos (aislamiento y biooxidación) se determinó la concentración de Fe^{2+} , Fe total, sulfatos y conteo bacteriano. Finalmente se realizó mediciones diarias de pH y potencial redox (Eh), se cuantificó la productividad volumétrica de hierro y sulfatos, porcentajes de hierro extraído y el rendimiento de oro obtenido al final del proceso.

CAPÍTULO I- MARCO TEÓRICO

1.1. Ubicación del yacimiento minero San Vicente

El yacimiento minero San Vicente se encuentra ubicado en el sector minero Chinapintza, del cantón Paquisha perteneciente a la provincia de Zamora Chinchipe localizada al Sur-Occidente del Ecuador, en la zona fronteriza con el Perú.

1.2. Biooxidación de sulfuros

La biooxidación se caracteriza principalmente por depender de la actividad bacteriana con habilidad de oxidar sulfuros, cuya presencia en el proceso ayudan a la recuperación del metal de interés. Estos microorganismos degradan la matriz donde está ocluido el elemento de interés (e. g. oro cobre, zinc, cobalto, etc.) (Akcil, 2004; Donati, 2006). La mayor aplicación de la biooxidación es para mejorar la extracción de oro cuando se encuentra bajo la forma de sulfuros como la molibdenita o pirita que son muy refractarias al ataque bacteriano, el producto final de este proceso es una solución ácida que contiene el oro de manera soluble. Este pretratamiento a menas refractarias se lo puede realizar en reactores de tanque agitado o en pilas (Dresher, 2004; Donati, 2006).

1.3. Bacterias usadas en el proceso de biooxidación

Los microorganismos utilizados en biominería tienen características fisiológicas en común, son todos quimiolitotróficos y son capaces de oxidar compuestos inorgánicos como azufre y/o hierro que son empleados como fuente de energía para su metabolismo (Jensen y Webb, 1995), son autótrofos porque asimilan directamente CO₂ del aire y además son acidófilos, debido a su capacidad de vivir en ambientes ácidos (pH bajos) siendo el ácido sulfúrico un producto de su metabolismo (Rossi, 1990; Rosales *et. al.*, 2001; Mejía, 2010).

Los microorganismos más conocidos en los procesos de biooxidación son los pertenecientes a los géneros *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum*.

1.3.1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

El *Acidithiobacillus ferrooxidans* antiguamente conocido como *Thiobacillus ferrooxidans* (Kelly *et. al.*, 2000), es una bacteria no patógena, fue aislada de drenajes ácidos en minas de carbón por Colmer y Hinkle en 1947. Es un bacilo gram negativo con un diámetro comprendido entre 0.5 a 0.6 µm y un largo de 1 a 2 µm, con extremos redondeados.

Su aceptor final de electrones es el oxígeno, por lo tanto se la considera como bacteria anaerobia facultativa porque utiliza ión férrico como aceptor de electrones para la disolución de los minerales (Rosales *et. al.*, 2001; Acevedo *et. al.*, 2005).

1.3.2. *Leptospirillum ferrooxidans.*

Pertenece a la división Nitrospira, es decir, concierne a un filo de bacterias gram negativas (Donati, 2006), esta bacteria fue aislada de un medio mineral de sulfuros de cobre en Armenia, por Markosyan en 1972. Posee forma de espiral, con ancho de 0.3 a 0.5 μm y longitud de 0.9 a 3.0 μm , altamente tolerante al ácido (pH óptimo 1.5 - 1.8) (Rossi, 1990; Rosales *et. al.*, 2001).

Se ha probado que su crecimiento no está beneficiado en ambientes de alto potencial redox, es decir, ambientes con más cantidad de Fe (III) que Fe (II) (Donati, 2006).

1.3.3. Mecanismos de biooxidación bacteriana.

Los microorganismos presentes en el proceso de biooxidación actúan en dos rutas bioquímicas, establecidas por la disolución ácida de los sulfuros: mecanismo vía tiosulfato, y la vía polisulfuro y azufre (Donati, 2006).

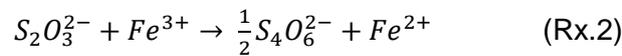
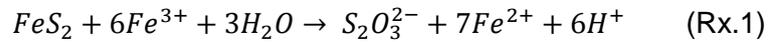
Mecanismos que operan de acuerdo a las características del mineral y a la capacidad de los sulfuros de ser disueltos por ácidos (Cárdenas *et. al.*, 2004).

1.3.3.1. Mecanismo vía tiosulfato.

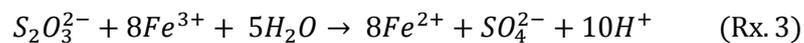
Los sulfuros metálicos como la pirita, molibdenita, tungestenita son solamente degradables por un ataque oxidante (Sand *et. al.*, 2001). A pH bajo, la velocidad de oxidación de la pirita (FeS_2) está intervenida por los iones férricos, a un pH neutro, los iones férricos (Fe^{3+}) son aceptores elegidos por los electrones. En consecuencia los iones férricos son los encargados del bajo o alto pH en la disolución de la pirita (Ballester, 2005).

Luego de seis pasos continuos de oxidación electrónica los iones hexahidratados de Fe (III) rompen enlaces entre el hierro y disulfuro en la red cristalina de la pirita, transformándose así en un ion tiosulfato, este es oxidado vía tetratiónato hasta llegar a sulfato, como se

muestra en las Rx. (1) y (2) (Sand *et. al.*, 1995; Sand *et. al.*, 2001; Acevedo *et. al.*, 2005; Donati 2006).



Por otro lado, cuando estas bacterias se fijan a la superficie mineral, el ión férrico hexahidratado ataca indirectamente al sulfuro metálico, generando así Fe^{2+} y tiosulfato. El tiosulfato es oxidado a sulfato, produciendo así ácido disulfano-monosulfónico y tritronato. Esto se puede evidenciar en la siguiente reacción (Rx. 3) (Cárdenas *et. al.*, 2004; Acevedo *et. al.*, 2005).



Por último, la bacteria permite la oxidación de ión ferroso (Fe^{2+}) a ión férrico (Fe^{3+}) esto es reciclado dentro del exopolimero. Las bacterias con habilidad de oxidar ion ferroso a férrico, como *T. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans*, generan una disolución efectiva de pirita (Acevedo *et. al.*, 2005). En la Figura 1 se muestra el mecanismo de tiosulfato.

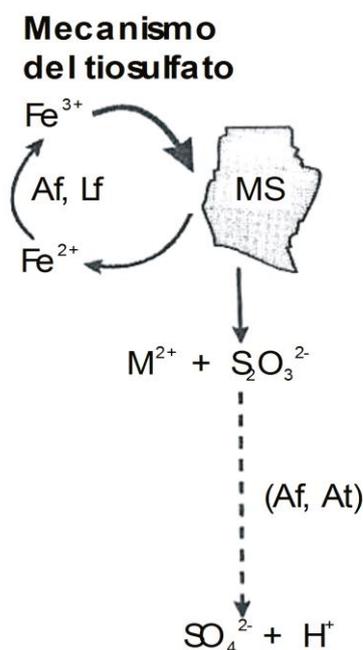


Figura 1.1 Mecanismos de tiosulfato en la biolixiviación de metales sulfurados MS (metal sulfurado); M^{2+} (metal ion); S_2O_3 (tiosulfato); Lf, Af, At (reacción enzimática por *T. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans*).

Fuente: Sand, 2001.

1.3.4. Cinética de crecimiento bacteriano.

El crecimiento o desarrollo bacteriano se refiere a un aumento ordenado de los componentes celulares, esto da lugar a un incremento de biomasa y por ende a un mayor número de bacterias (Lacey *et. al.*, 1970; Sánchez, 2013).

En una cinética de crecimiento se evidencian cuatro fases (Rossi, 1990).

- La fase de latencia
- La fase exponencial
- La fase estacionaria
- La fase de declive

La velocidad de crecimiento en un proceso de biooxidación o biolixiviación está relacionada con la concentración de iones ferrosos en la solución.

El modelo más utilizado para el crecimiento bacteriano es el de Monod:

$$\mu = \frac{\mu_M C_{Fe^{2+}}}{K_S + C_{Fe^{2+}}}$$

μ = Velocidad específica de crecimiento en el líquido, d^{-1}

μ_M = Velocidad específica máxima de crecimiento en el líquido, d^{-1}

$C_{Fe^{2+}}$ = Concentraciones de iones ferroso, g/L

K_S = Constante de la ecuación de Monod, g/L

1.4. Proceso de biooxidación en tanques agitados

Los biorreactores de tanque agitado son los más utilizados para dar tratamiento a los minerales refractarios, poseen ventajas como: fácil control de las variables y sobre todo menor tiempo de residencia en el proceso de solubilización (López, 2007; Arroyave, 2008). Este proceso de biooxidación se da en tres fases (Rossi, 2001). La fase gaseosa donde suple los requerimientos de oxígeno para los microorganismos (el oxígeno ayuda en la oxidación de los sulfuros). La fase acuosa donde ocurre el crecimiento de microorganismos y enlace con las partículas, y la fase sólida es el mineral molido compuesto de sulfuros, estos sulfuros son oxidados por la acción bacteriana (Acevedo, 2000; Rossi, 2001).

En el proceso utilizando biorreactores se asegura la transferencia de masa y calor, suspensión de sólidos, mantiene las condiciones para el crecimiento microbiano y disminuye las gradientes de concentración, temperatura y pH en el interior de biorreactor (Deveci, 2004; Arroyave, 2008).

1.4.1. Biooxidación en un sistema por lotes.

Llevar a cabo la biooxidación en un sistema por lotes es importante para un escalamiento ya que aquí se obtiene datos cinéticos confiables para diseñar biorreactores a gran escala. En la biooxidación por lotes (sistema cerrado) la alimentación se da por la parte superior para luego ser inoculado con microorganismos (Cuevas, 2013). El bioproceso culmina cuando todo el sustrato se haya consumido y los productos del metabolismo inhiban el proceso. (Canales *et. al.*, 2003; Levenspiel, 2005; Scott, 2008).

1.4.2. Factores que intervienen en el proceso de biooxidación.

1.4.2.1. Factores físicos.

1.4.2.1.1. Temperatura.

La temperatura es un parámetro que tiene efecto sobre: el crecimiento celular, la velocidad de reacción, las interacciones electroquímicas medio-mineral y la formación de precipitados (Gómez *et. al.*, 2005; Arroyave, 2008; Jaramillo, 2014;). Las condiciones óptimas de temperatura están dadas por un nivel máximo o mínimo de energía, ya que así las reacciones se dan a una velocidad aceptable.

Como anteriormente se ha dicho, los procesos de biooxidación tienen un máximo de temperatura por encima del cual las reacciones de oxidación se inhiben. Dado que los microorganismos del género *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* son organismos mesófilos, la temperatura máxima es de alrededor 43°C, con un intervalo óptimo entre 20 y 35°C (Mejía, 2010). A bajas temperaturas (menor a 20°C) la fase de latencia para los microorganismos será muy larga e incluso puede causar la muerte, mientras que a 20°C se adaptan los microorganismos en pocos días y el pH disminuye rápidamente esto como consecuencia de la producción de ácido debido a la oxidación bacteriana (Alegre, 1997).

1.4.2.1.2. *Tamaño de la partícula.*

El tamaño está relacionado con el área superficial del mineral, mayor área favorece la solubilización del mineral pues habrá una mejor adherencia de las células a la superficie (Arroyave, 2008). Estudios demuestran que el tamaño óptimo de la partícula está entre 75 μ m-150 μ m, mayor a este intervalo reduce la velocidad de oxidación de los sulfuros (Alegre, 1997).

1.4.2.1.3. *Densidad de pulpa (p/v).*

En un proceso de biooxidación este factor cumple un papel importante, cuando se utiliza densidades de pulpa menores al 20% la velocidad de solubilización del mineral es directamente proporcional a la concentración de sólidos. Al aumentar esta concentración aumenta la concentración de mineral (Kg/m³) y la concentración de área superficial (m²/m³) y por tal razón un aumento de área superficial hay incremento del número de bacterias que se adhieren al mineral (μ /m²) y de hecho la velocidad total de crecimiento, esta última trae consigo velocidad de consumo de oxígeno y CO₂ y de la velocidad de producción de sulfatos e ion ferroso mediante la acción bacteriana, por ende el ión ferroso producido es oxidado a ión férrico (González, 1999).

Operar con densidades mayores al 20% en reactores de tanque agitado no ha tenido buenos resultados (Rossi, 2001; Deveci, 2004) porque puede afectar la biooxidación. Como se explicó anteriormente la adherencia de las bacterias será beneficiada por un aumento de área superficial, sin embargo un excesivo incremento para un inóculo de tamaño constante siempre disminuirá la relación bacteria/sólido, motivo que reducirá el coeficiente de transferencia de masa (Hansford *et. al.*, 1995) habrá fricción entre las partículas y la velocidad de solubilización del mineral será mínima, debido a que estos factores causan daño celular y limita las velocidades de transferencia de oxígeno incrementando el tiempo de biooxidación (Rossi, 2001; Deveci, 2004; Arroyave, 2008).

1.4.2.1.4. *Agitación y aireación.*

Una adecuada agitación y aireación de las partículas del mineral aumenta la velocidad de transferencia de oxígeno y dióxido de carbono, nutrientes, iones férricos, etc. (González *et. al.*, 2003; Arroyave, 2008). La agitación y aireación están influenciados por la concentración de sólidos; tamaño de las partículas; el diseño del rotor, así como su tamaño, número y ubicación dentro del biorreactor (González, 1999).

En los sistemas de biooxidación, bajos niveles de agitación afectan las operaciones de transferencia de masa, por otro lado la intensa agitación ocasiona mayor fricción entre las partículas y por ende existirá inhibición del crecimiento celular (Arroyave, 2008). González *et. al.*, (2003) ha demostrado que el rotor tipo turbina de flujo axial de bombeo hacia arriba es el adecuado, causa menor daño a las células y provocan buena suspensión de sólidos.

1.4.2.2. **Factores Químicos.**

1.4.2.2.1. *pH.*

El pH influye de forma significativa en la velocidad de crecimiento de los microorganismos, debido a que afecta a los grupos ionizables presentes en las enzimas situadas en el citoplasma y periplasma de la célula (Gómez *et. al.*, 2005).

Para obtener valores máximos de oxidación de sulfuros y recuperación de oro es necesario hacer un control de pH para evitar la formación de precipitados. El rango típico de pH en el proceso de biooxidación está entre 1.2-2. Un pH menor reduce la actividad bacteriana y la oxidación de los sulfuros, mientras que niveles de pH superiores pueden reducir la extensión de oxidación y por ende disminuye la recuperación de oro debido a la precipitación de sales metálicas (González, 1999; Gómez *et. al.*, 2005).

1.4.2.2.2. *Potencial redox (Eh).*

El potencial de óxido-reducción es un indicador del metabolismo energético o actividad bacteriana. La oxidación de especies sulfuradas se caracteriza por la presencia de un potencial mixto, donde se dan simultáneamente dos procesos electroquímicos fuera del equilibrio: la oxidación del sulfuro y la reducción del ión férrico (González, 1999).

1.4.2.3. Factores biológicos.

1.4.2.3.1. Nutrientes.

Acidithiobacillus ferrooxidans y *Leptospirillum ferrooxidans* necesitan los elementos nutricionales que deben estar en ciertas cantidades proporcionales a su composición celular en el medio de cultivo en forma de sales. Sulfato de amonio (fuente de N), cloruro de potasio (fuente de K), fosfato de potasio dibásico K_2HPO_4 (fuente de P), sulfato de magnesio (fuente de Mg), fuente de energía el sulfato ferroso ($FeSO_4$) (Arroyave, 2008).

Si un nutriente está presente en bajas concentraciones, el crecimiento celular ocurrirá a una menor velocidad.

1.4.2.3.2. Oxígeno y dióxido de carbono.

Como se sabe la *T. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* son microorganismos quimioautotróficos y aerobios que necesitan el oxígeno molecular como aceptor final de electrones en la oxidación de iones ferrosos, sulfuros y azufre, y suple sus necesidades de carbono fijando CO_2 mediante en ciclo de Calvin-Benson, en general la presencia de estos compuestos gaseosos favorece el crecimiento de la bacteria y la biooxidación del mineral (González 1999).

1.4.2.3.3. Adherencia de las células al mineral.

La adherencia de las bacterias al mineral ocurre por dos aspectos: el aspecto cinético la velocidad a la que se adhieren las células al mineral, y el aspecto de más importancia, la caracterización termodinámica de la adherencia, es decir, en qué condiciones se establece el equilibrio. Los polímeros extracelulares conocidos como EPS contiene iones férricos que son responsables de la adherencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* a sustratos sólidos cargados negativamente (González, 1999).

La velocidad de crecimiento de estas bacterias en el medio líquido depende de la concentración de iones ferrosos en la solución y en mineral está a expensas de azufre elemental y sulfuros (González, 1999; Arroyave, 2008).

1.5. Objetivos

Objetivo general

- Buscar y aislar microorganismos acidófilos nativos de los drenajes naturales de los yacimientos auríferos de San Vicente ubicado en la provincia de Zamora Chinchipe para ser utilizados en el proceso de Biooxidación de minerales sulfurados y ver la recuperación de oro después del proceso de cianuración.

Objetivos específicos

- Prospección de microorganismos acidófilos en el yacimiento aurífero San Vicente de la provincia de Zamora Chinchipe.
- Aislar y determinar las condiciones de crecimiento de microorganismos acidófilos que pueden estar presentes en el distrito minero San Vicente y que puedan ser útiles para el proceso de biooxidación.
- Determinar la concentración de pulpa para el crecimiento de microorganismos acidófilos en un sistema por lotes de tanque agitado de 5 litros.
- Cuantificar el oro liberado de la estructura mineral después del proceso de cianuración.

Hipótesis de trabajo

H₀: La densidad de pulpa no influye en la productividad volumétrica obtenida en el proceso de biooxidación.

H₁: La densidad de pulpa influye en la productividad volumétrica obtenida en el proceso de biooxidación.

H₀: El oro recuperado no es mayor luego del proceso de biooxidación y cianuración.

H₁: El oro recuperado es mayor luego del proceso de biooxidación y cianuración.

CAPÍTULO II- METODOLOGÍA

2.1. Lugar de muestreo

Las muestras para el aislamiento y el proceso de biooxidación, fueron recolectadas del yacimiento minero San Vicente en la provincia de Zamora Chinchipe con coordenadas UTM 17769305 E, 9553081 N, a 1456 msnm.

2.1.1. Muestras para aislamiento de microorganismos.

Se obtuvieron las muestras a partir de drenajes ácidos, lodos y sedimentos, estas fueron colocadas en frascos estériles y transportadas en una nevera plástica para mantener las condiciones ambientales a las que fueron encontradas. Se midió temperatura y pH a la que se encontraron las muestras con un termómetro y pH-metro marca HANNA (modelo HI 8424).

2.1.2. Muestra para proceso de biooxidación.

El mineral se obtuvo del mismo yacimiento minero, el cual es considerado de mucho interés debido a que posee leyes importantes de oro oculto en minerales sulfurados que pueden ser tratados por procesos como la biooxidación. Se obtuvieron aproximadamente 10 kg de mineral el cual fue colocado y etiquetado en bolsas plásticas reforzadas, posteriormente se concentró en mesa gravimétrica, obteniendo 5.65 kg de concentrado de sulfuros.

Se homogeneizó y cuarteó el mineral por el método de los cuatro cuadrantes, obteniendo 3 kg de muestra para los análisis: granulométrico, químico y mineralógico.

El mineral y las muestras se almacenaron en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Universidad Técnica Particular de Loja.

2.2. Aislamiento del consorcio microbiano

2.2.1. Diseño experimental

Para el aislamiento del consorcio microbiano se realizó un diseño factorial 2^2 en el programa Minitab 16, los ensayos se realizaron por triplicado.

A partir de los resultados obtenidos de productividad volumétrica ($Q_p \text{ Fe}^{3+}$, g/L día) y velocidad específica de crecimiento (μ , h^{-1}) se realizó un análisis de regresión lineal utilizando el método de mínimos cuadrados, en el programa estadístico IBM SPSS Statistics 20 para ver la influencia de las variables (pH y temperatura).

En la Tabla 2.1 se presenta las variables dependientes e independientes y los valores constantes utilizados en el diseño experimental.

Tabla 2.1. Diseño experimental utilizado para el aislamiento de microorganismos.

Diseño a utilizar	Variable independiente	Valores de la variable independiente	Variables dependientes	Valores Constantes
Diseño Factorial	pH Temperatura	pH= 1.8 y 3.4 T= 30 y 17 °C	Hierro férrico obtenido (g/L) Sulfato Obtenido (g/L) Velocidad de crecimiento(μ)	RPM: 200 Concentración inicial del inóculo 20%v/v Tiempo 1-20 días

Elaborado por: Gabriela González

2.2.2. Aislamiento y adaptación de microorganismos en medios específicos.

El medio de cultivo que se usó fue de Silverman y Lundgren (1959) (Tabla 2.2) para aislar microorganismos quimiolitotróficos y acidófilos. Inicialmente se preparó en 1000mL de agua destilada 50 veces concentrado y se ajustó el pH a 1.8, finalmente éste fue esterilizado.

Tabla 2.2 Composición del medio de cultivo Silverman y Lundgren (1959).

Nombre químico	Fórmula química	Concentración (g/L)
Sulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3
Cloruro de potasio	KCl	0.1
Fosfato de potasio dibasico	K_2HPO_4	0.5
Sulfato de magnesio	MgSO_4	0.5
Sulfato ferroso (Fuente de energía)	FeSO_4	44.2

Fuente: Silverman y Lundgren (1959)

En matraces Erlenmeyer de 250mL se colocaron: 2mL de medio 9K (50 veces concentrado), 88mL de agua destilada desionizada y 10mL de drenaje ácido, lodo y sedimento. Para cada bioensayo se utilizó sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) como fuente de energía en una proporción de 44.2g/L. Finalmente, los matraces se incubaron a temperaturas diferentes (30°C y 20°C), a pH de 3.44 y 1.8 y con agitación constante de 200rpm en un agitador orbital marca BigBill.

Para lograr la adaptación de los microorganismos aislados en el medio selectivo, se realizó repiques en el momento de cambio de color (verdoso a rojizo), inoculando así a un nuevo matraz con los mismos contenidos anteriores a fin de conseguir microorganismos con una velocidad de crecimiento óptima. Durante este proceso a cada matraz se le hizo conteo celular en microscopio usando cámara de Neubauer. Se llevaron a cabo 3 repeticiones por muestra.

2.2.3. Caracterización morfológica del consorcio microbiano

Por observaciones microscópicas se determinó la forma y tamaño del consorcio microbiano aislado con el fin de dar una aproximación a qué tipo de microorganismos se aisló. Esto se realizó por tinción Gram (Anexo 1) (Benito *et. al.*, 2013), posteriormente se utilizó el programa ImageJ versión 1.45k para determinar el tamaño de los microorganismos que conforman el consorcio.

2.4. Análisis mineralógico y químico

Para el análisis mineralógico fue necesario enviar la muestra de cabeza al Departamento de Metalurgia Extractiva (DEMEX) de la Escuela Politécnica Nacional, se efectuó mediante análisis por difracción de rayos X (DRX) (Anexo 2).

El análisis químico se le realizó a la muestra de cabeza y al mineral cianurado, el proceso se dio en el Laboratorio de Metalurgia Extractiva área DGMIC de la Universidad Técnica Particular de Loja, los metales analizados fueron: Oro y Plata. Para la determinación de estos metales fue necesario aplicar la técnica de ensayo al fuego cuyo procedimiento se lo presenta en el (Anexo 3).

2.5. Molienda del mineral y análisis granulométrico

El mineral cuarteado y homogenizado fue sometido a un análisis granulométrico en un vibrotamiz marca Retsch con una serie tamices ASTM. Ya que no se obtuvo el tamaño de partícula deseado (80% la malla 200), se realizó una molienda bajo las siguientes condiciones: húmedo en una dilución de pulpa 1:1, porcentaje de carga del 40%, velocidad experimental de 63 rpm en un tiempo de 20min.

El mineral molido se secó en una estufa marca Memmert a 150°C, posteriormente con un rodillo se disgregó el material y se realizó una segunda granulometría con el que se determinó el D80. La curva granulométrica se presenta en el Anexo 4.

2.6. Acidificación y adaptación de microorganismos a mineral

Al mineral molido se acidificó en matraces Erlenmeyer de 2000mL en una solución final de 700mL, con 2% p/v de mineral, 2mL de medio 9K modificado por Kim (2002) (50 veces concentrado) (Tabla 2.3), 2% de inductor (Fe^{2+}). Se utilizó ácido sulfúrico 4M para lograr un acondicionamiento de la pulpa a un pH 1.8 la medición se la realizó con un pH metro marca Hanna (modelo HI 8424). Este proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente y a 200rpm.

Tabla 2.3. Composición del medio 9K modificado.

Compuesto químico	Fórmula química	Concentración (g/L)
Cloruro de potasio	KCl	0.1
Sulfato de Magnesio heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
Fosfato de amonio	$NH_4(H_2PO_4)$	1
Ácido Sulfúrico	H_2SO_4	Hasta pH=1.8

Fuente: Kim (2002)

Elaborado por: Gabriela González

Los microorganismos (aislados en el apartado 2.2.) fueron adaptados a medio modificado con mineral. Se colocó el 10% v/v de inóculo al matraz con mineral acidificado, previamente. La etapa de adaptación duro aproximadamente 15 días, hasta que la concentración de ion ferroso (Fe^{2+}) fue mínima y constante. En el apartado 2.8 se describen los indicadores para el control del proceso de adaptación de los microorganismos.

2.7. Biooxidación por lote

2.7.1. Diseño experimental.

Se realizó un diseño experimental por bloques para evaluar si la densidad de pulpa influye en la productividad volumétrica obtenida en el proceso de biooxidación. Se obtuvo un total de 12 experimentos.

Se efectuó un ANOVA en el programa estadístico IBM SPSS Statistics 20, para evaluar la productividad volumétrica de ion férrico y sulfatos con respecto a los porcentajes de pulpa.

En la Tabla 2.4 se presenta las variables dependientes, independientes y valores constantes del diseño experimental utilizado.

Tabla 2.4. Diseño experimental utilizado en la biooxidación por lote del mineral aurífero refractario.

Diseño a utilizar	Variable independiente	Valores de la variable independiente	Variables dependientes	Valores Constantes
Diseño por Bloques	Densidad de pulpa	%(p/v)= 5, 10, 15, 20	Hierro férrico obtenido (g/L) Sulfato Obtenido (g/L) Velocidad de crecimiento(μ_{max}) Productividad volumétrica de hierro y sulfato Oro obtenido	Agitación 400rpm Concentración inicial del inóculo 20%v/v Tiempo 30 días Aeración 3vvm Temperatura 20°C

Elaborado por: Gabriela González

2.7.2. Descripción y ajuste de reactores para el sistema por lotes.

Los reactores usados en este proceso son de acero inoxidable, se ocuparon cuatro reactores de 5 litros de capacidad, presentan un eje móvil con aspa de tres hélices conectados a un motor de 0.5HP dando una agitación que puede ir desde 300 hasta 900 rpm. Estos tanques contienen un sistema de aireación que consiste en un difusor y un medidor de flujo (marca cole Parmer) conectados a un compresor de aire. Las condiciones de operación para este sistema fueron: altura de rotor desde el fondo del tanque (3.5cm),

flujo de aire (3vvm), agitación (400rpm) y temperatura ambiente (20°C) (Jaramillo *et. al.*, 2014).

Una vez adaptado el inóculo al mineral acidificado se llevó a cabo el proceso de biooxidación. En los reactores se mezclaron 600mL de inóculo más 2340mL de pulpa acidificada, que contenía medio 9K modificado utilizando como inductor sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Este proceso se dio a diferentes densidades pulpa (5, 10, 15 y 20 % p/v).

El proceso finalizó cuando la concentración de Fe^{2+} permaneció constante en el tiempo y fue mínima, indicando que el ion ferroso fue oxidado completamente a Fe^{3+} . Durante el proceso oxidativo se realizaron diariamente mediciones analíticas, estas se detallan en el apartado 2.10.

2.7.3. Microorganismos.

En el proceso de biooxidación se utilizó el consorcio microbiano (Muestra 5) previamente aislado a pH 1.8 y 20°C.

2.8. Indicadores indirectos del crecimiento microbiano

Las mediciones analíticas como cuantificación de ión ferroso, hierro total, sulfatos, conteo celular, pH y potencial redox (Eh), que se detallan a continuación, se realizaron diariamente para el aislamiento de los cultivos microbianos, así como para la adaptación de éstos al medio modificado con mineral y para el proceso biooxidativo realizado por lotes.

2.8.1. Determinación de ion ferroso, hierro total e ion férrico.

El ion ferroso se determinó aplicando el método espectrofotométrico de Muir y Andersen (1977) el cual se basa en el desarrollo de color por el Fe^{2+} al reaccionar con 1,10-fenantrolina (Alegre, 1997; González, 1999).

El hierro total se midió, como lo propuso Muir, por la reducción de Fe^{3+} con una solución acuosa de hidroxilamina, y midiendo el Fe^{2+} . El ion férrico Fe^{3+} se determina por la diferencia entre ion ferroso y hierro total (Herrera, 1989; González, 1999) (Anexo 5).

2.8.2. Determinación de ion sulfato.

El ion sulfato en solución se determinó por el método turbimétrico. Éste es precipitado en un medio ácido con cloruro de bario el cual permite la formación de cristales uniformes de sulfato de bario (Herrera, 1989; González, 1999) (Anexo 6).

2.8.3. Determinación del número de células.

El conteo directo del número de células se realizó con una cámara de Neubauer (Anexo 7). Para determinar el número de células por mL fue necesario aplicar la siguiente Ecuación (1).

$$\frac{\#bac}{ml} = \frac{4.10^6 * FD * \#bac.contadas}{20} \quad (Ec.1)$$

2.8.4. Determinación de pH y Eh (potencial Redox).

La medida del pH y Eh se realizó con un pH-metro marca Hanna (modelo HI 8424).

2.9. Cianuración

Después del proceso de biooxidación fue necesario realizar la cianuración a las muestras para cuantificar el oro liberado. Primero, el mineral biooxidado se sometió en agua ácida con el fin de eliminar jarosita formada durante el proceso. Luego se procedió a lavar con agua potable para subir el pH y evitar el alto consumo de cal. Finalmente, la cianuración se llevó a cabo en el equipo de jarras Phipps & Bird (modelo PB-750). En el Anexo 8 se establecen las condiciones de operación utilizadas en el proceso de cianuración.

2.10. Determinación de oro

Mediante la técnica de ensayo a fuego para metales preciosos se pudo cuantificar el oro y la plata (doré) presentes en las muestras minerales cianuradas. Mediante espectrofotometría de absorción atómica (marca Perkin Elmer) se determinó la concentración de oro en solución y se realizó los respectivos balances metalúrgicos para la obtención del rendimiento final.

CAPÍTULO III- RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Prospección y aislamiento de microorganismos a partir de aguas ácidas, lodos y sedimentos

3.1.1. Prospección.

Los parámetros físico-químicos que se tuvo en cuenta para la prospección fueron la temperatura y pH. Las muestras (lodo, sedimentos y aguas ácidas) se encontraron a una temperatura de 20°C y a un pH de 3.4 indicándonos posible presencia de microorganismos acidófilos.

El color de estas muestras fue un indicador que proporcionó información interesante sobre el tipo de metal disuelto. Así el color amarillo-rojizo se debe a la presencia de una elevada concentración de ión ferroso (Anexo 13).

3.1.2. Aislamiento de microorganismos.

Las muestras obtenidas del yacimiento San Vicente, crecieron en el medio selectivo para bacterias acidófilas (*A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans*). El cambio de coloración en el medio de cultivo de verdoso a rojizo fue un indicador del crecimiento de los microorganismos debido a la oxidación de sulfato en un período de 4 semanas (Anexo13). De acuerdo a Kelly y Wood (2000) este tipo de especies crecen en medios específicos como los propuestos anteriormente con sulfato ferroso, tiosulfato o sulfuros metálicos como fuente de energía. Alegre (1997) logró aislar y adaptar cepas bacterianas 3 semanas aproximadamente.

3.1.2.1. Análisis estadístico del aislamiento de cepas microbianas.

3.1.2.1.1. Efectos de pH y temperatura sobre la productividad (Qp) de hierro de los cultivos aislados del yacimiento San Vicente.

Se realizó un análisis factorial en el programa Minitab 16, con el propósito de analizar cuáles fueron las mejores condiciones de pH y temperatura para obtener mayor crecimiento de las cepas microbianas.

De acuerdo a la Figura 3.1 y 3.2 las mejores condiciones de crecimiento microbiano se obtuvieron a pH 1.8 y temperatura de 20°C con respecto a la productividad volumétrica de ion férrico ($Q_p \text{ Fe}^{3+}$, g/L día). Siendo resultados factibles debido a que el proceso de

biooxidación se dará a las mismas condiciones obtenidas en el aislamiento. Alegre (1997) indica que se utiliza pH de 1.8 para evitar la formación considerable de precipitados, situación que se presenta a pH mayores a 2.

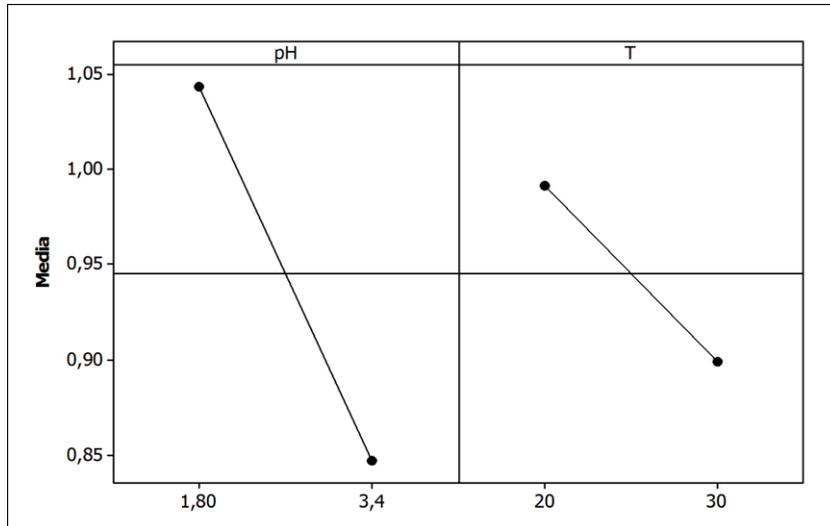


Figura 3.1. Efectos principales de pH y temperatura con respecto a la productividad volumétrica ion férrico ($Q_p \text{Fe}^{3+}$, g/L día).

Fuente: Minitab 16

Elaborado por: Gabriela González

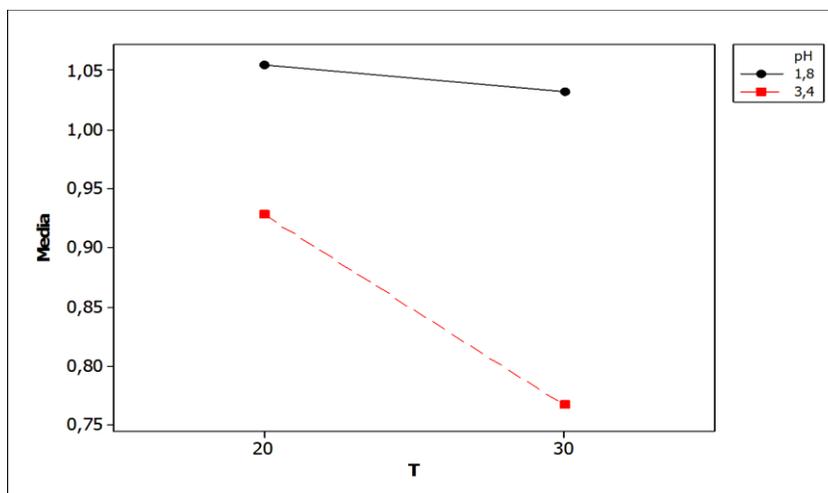


Figura 3.2. Interacción de pH y temperatura con respecto a la productividad volumétrica de ion férrico ($Q_p \text{Fe}^{3+}$, g/L día) durante el aislamiento del consorcio microbiano.

Fuente: Minitab 16

Elaborado por: Gabriela González

Con el propósito de conocer cuál de las dos variables (pH y temperatura) influyen en el crecimiento microbiano se realizó un análisis de regresión lineal utilizando el método de mínimos cuadrados en el programa estadístico IBM SPSS Statistics 20.

En la Tablas 3.1 y 3.2 se aprecia que la variable que influye más es el pH, tanto en la productividad volumétrica ($Q_p \text{ Fe}^{3+}$, g/L día) como en la velocidad de crecimiento (μ , h^{-1}). Esto se puede observar en el coeficiente B obtenido, el cual fue -0.229 y -0.019, respectivamente. Estos valores son mayores al obtenido en la temperatura, el signo negativo indica que el pH es inversamente proporcional a la productividad volumétrica ($Q_p \text{ Fe}^{3+}$, g/L día) y a la velocidad específica de crecimiento (μ , h^{-1}). Debido a que el consorcio tiene característica acidófila en bibliografía se ha demostrado que estos microorganismos pueden vivir en ambientes difíciles debido a su alta capacidad de adaptación (Velásquez, 2014), por ello que el pH óptimo de las bacterias acidófilas es 1.8 ya que a pH mayores a 2 el ion férrico es poco soluble. La influencia de la temperatura no es tan significativa debido a que se encuentra dentro del rango establecido para bacterias mesófilas que es 20-35°C (Muzzio, 2002).

Tabla 3.1. Coeficientes de regresión lineal con respecto a la variable dependiente productividad volumétrica ($Q_p \text{ Fe}^{3+}$, g/L día) obtenida en el aislamiento.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	Sig.	R	R cuadrado	Error típ. De la estimación	
	B	Error típ.	Beta					
1	(Constante)	1.944	0.199	-	0.010	0.976	0.952	0.6599
	pH	-0.229	0.038	-0.939	0.027			
	°C	-0.018	0.006	-0.466	0.097			

Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 20.

Elaborado por: Gabriela González

Tabla 3.2. Coeficientes de regresión con respecto a la variable dependiente velocidad específica de crecimiento (μ , h^{-1}) obtenida en el aislamiento.

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	Sig.	R	R cuadrado	Error típ. De la estimación
		B	Error típ.	Beta				
1	(Constante)	0.358	0.008	-	0.008	0.988	0.977	0.01034
	pH	-0.019	0.089	-0.344	0.059			
	°C	-0.009	0.012	-0.986	0.012			

Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 20.

Elaborado por: Gabriela González

A partir de 43 matraces inoculados en los que existió crecimiento celular, solamente se escogieron 5 matraces los cuales contenían lodo, sedimento y agua ácida. Estos mostraron tener un mayor número de células en el conteo realizado en la cámara de Neubauer. De estas muestras se cuantificó la productividad volumétrica de ion férrico ($Q_p Fe^{3+}$, g/L día) y la velocidad específica de crecimiento (μ , h^{-1}).

Como se muestra en la Tabla 3.3 y de acuerdo a los análisis estadísticos mostrados anteriormente se puede decir, que la Muestra 5 proveniente del aislamiento, presenta mayor productividad volumétrica y velocidad específica de crecimiento a pH de 1.8 y 20°C por lo que se escogió esta muestra para su adaptación a mineral y posterior uso en el proceso de biooxidación.

Tabla 3.3. Velocidad de crecimiento máxima y productividad volumétrica de las cepas aisladas a diferente pH y temperatura.

	Valores obtenidos		Valores constantes	
	μ (h^{-1})	$Q_p Fe^{3+}$ (g/L día)	pH	Temperatura (°C)
Muestra 1	0.038	0.607	3.4	30
Muestra 2	0.055	1.057	1.8	30
Muestra 3	0.075	0.930	1.8	30
Muestra 4	0.120	0.816	3.4	20
Muestra 5	0.154	1.055	1.8	20

Elaborado por: Gabriela González

3.1.3. Determinación de las cinéticas de crecimiento microbiano en medio 9K.

A la muestra escogida (Muestra 5) se le realizó la respectiva cinética de crecimiento microbiano, se determinó la concentración de ión ferroso (Fe^{2+}), Fe total e ion férrico (Fe^{3+}), finalmente se midió el pH y potencial redox (Eh). Las variables constantes utilizadas fueron: agitación (200rpm) y temperatura (20°C).

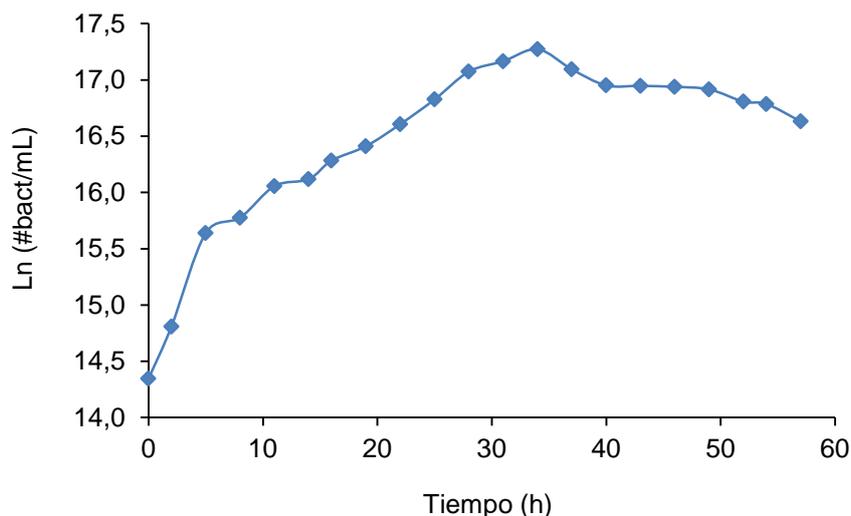


Fig.3.3. Cinética de crecimiento del consorcio microbiano (Muestra 5) a pH 1.8 y 20°C.
Elaborado por: Gabriela González

En la Figura 3.3 se observa el número de bacterias por mililitro (#bact/mL) en función del tiempo (h). Presenta un crecimiento exponencial hasta las 33 horas, a partir de este tiempo el crecimiento microbiano tiende a ser constante (etapa estacionaria); finalmente se evidencia la etapa de declive en donde los microorganismos van disminuyendo gradualmente.

El crecimiento máximo que se obtuvo para este bioensayo fue de $3.5 (10)^7$ #bac/mL, crecimiento igual al obtenido por Barahona (2014) que fue de $3.5 (10)^7$ #bac/mL a pH 1.7 y 30°C. El crecimiento óptimo para este consorcio microbiano fue de aproximadamente 30 horas.

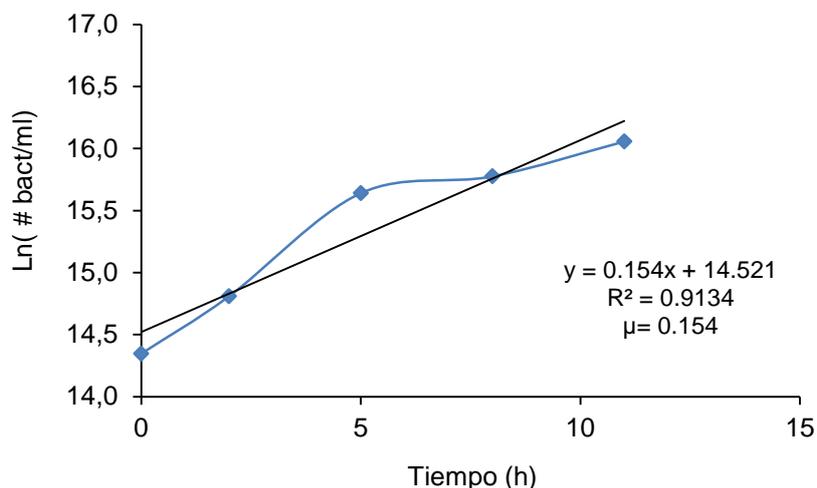


Figura 3.4. Velocidad de crecimiento del consorcio microbiano previamente aislado a pH 1.8, 200rpm y 20°C.

Elaborado por: Gabriela González

En la Figura 3.4 se presenta la velocidad específica de crecimiento microbiano μ (h^{-1}), que fue de 0.154 h^{-1} . Este resultado es análogo al obtenido por Alegre (1988) el cual trabajó a 30°C y pH 1.8 y obtuvo $\mu = 0.141 \text{ h}^{-1}$, además son semejantes a los reportados por Benítez (2009) quien logró velocidades de crecimiento a 30°C de $0.123 - 0.134 \text{ h}^{-1}$. Con esto se corrobora que la temperatura no influye de una manera significativa durante este aislamiento.

3.1.4. Lixiviación de ión ferroso (Fe^{2+}) y hierro total.

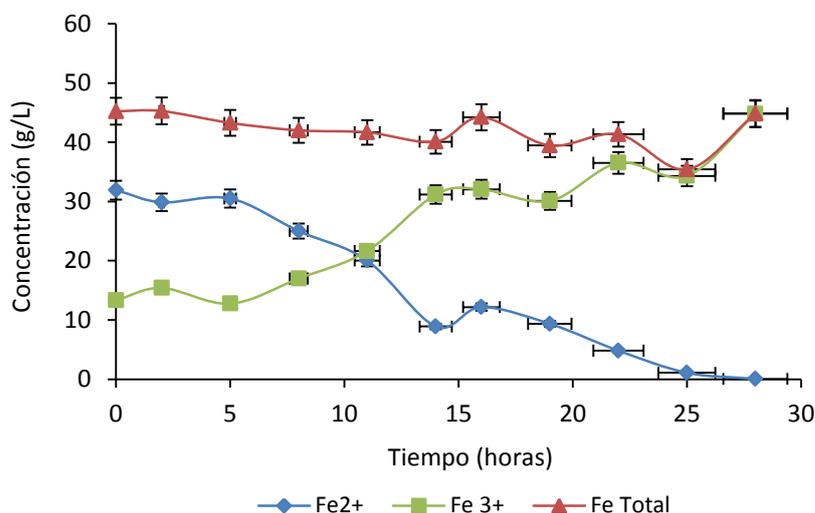


Figura 3.5. Variación de ion ferroso (Fe^{2+}), Fe total e ion férrico (Fe^{3+}) del consorcio microbiano (Muestra 5) aislado en medio de cultivo Silverman y Lundgren (1959) a pH 1.8 y 20°C .

Elaborado por: Gabriela González

En la Figura 3.5 se puede visualizar que la concentración de Fe^{3+} tiende a aumentar en el tiempo mientras que Fe^{2+} disminuye, demostrando así que existe una oxidación biológica de Fe^{2+} a Fe^{3+} .

Este consorcio microbiano agota el sustrato en aproximadamente 28 horas; la máxima concentración de hierro total presente en solución fue de 44.85 g/L, 0.060 g/L de ión ferroso (Fe^{2+}) y 44.79 g/L de ion férrico al final del periodo de oxidación. El tiempo obtenido en este ensayo fue corto en comparación con los reportados en Melvin *et. al.*, (1958) en cuyo cultivo se oxida el ión ferroso en 3 a 4 días a 28°C, esto es debido a que las bacterias están adaptadas a la concentración de inductor utilizado, en un medio definido (44 g/L), el mismo que favoreció el proceso oxidativo (Aguirre *et. al.*, 2013). Cabe mencionar que solamente se midió el hierro total en solución más no el precipitado en forma de jarosita.

3.1.5. Análisis de pH y potencial de óxido reducción (Eh).

En la Figura 3.6 se puede apreciar el comportamiento del pH y Eh a través del tiempo. Para el cultivo los valores de pH aumentaron hasta las 22 horas, esto se debe a que las bacterias necesitan protones para realizar la oxidación del ion ferroso (Fe^{2+}) a ion férrico (Muñoz, 2002), luego de este tiempo el pH tiende a disminuir nuevamente a un valor de 2.13 debido a la formación de ácido sulfúrico dada por acción bacteriana y por hidrolisis de hierro férrico liberado (Fe^{3+}) en solución acuosa, esto concuerda con Jensen y Webb (1995).

Por otro lado, se muestra el comportamiento del potencial redox, el cual va incrementando en el tiempo a partir de las 22 horas. En general se alcanzaron valores máximos de 275.3 mV, lo cual nos indica que aumenta a medida que las bacterias oxidan iones ferrosos a iones férricos (Cardona *e.t al.*, 2009). Eh tiene un comportamiento inversamente proporcional al pH.

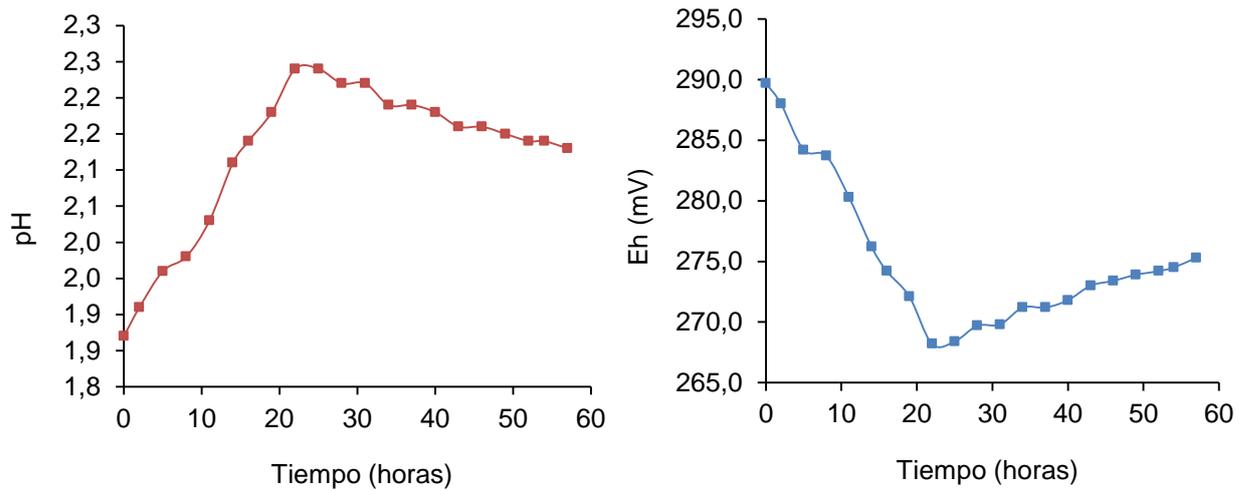


Figura 3.6. Variación de pH y Eh (mV) del consorcio microbiano aislado a pH 1.8 y 20°C (M5).

Elaborado por: Gabriela González

3.1.6. Caracterización morfológica de la Muestra 5

3.1.6.1. Identificación por tinción Gram.

El consorcio aislado (Muestra 5) observado al microscopio presentó únicamente bacterias de color rosado (Gram negativos) y con forma bacilar de longitud pequeña (Figura 3.7). Estas tinciones fueron contrastadas con la morfología y propiedades bioquímicas de la cepa *Acidithiobacillus ferrooxidans*, dándonos así una similitud.

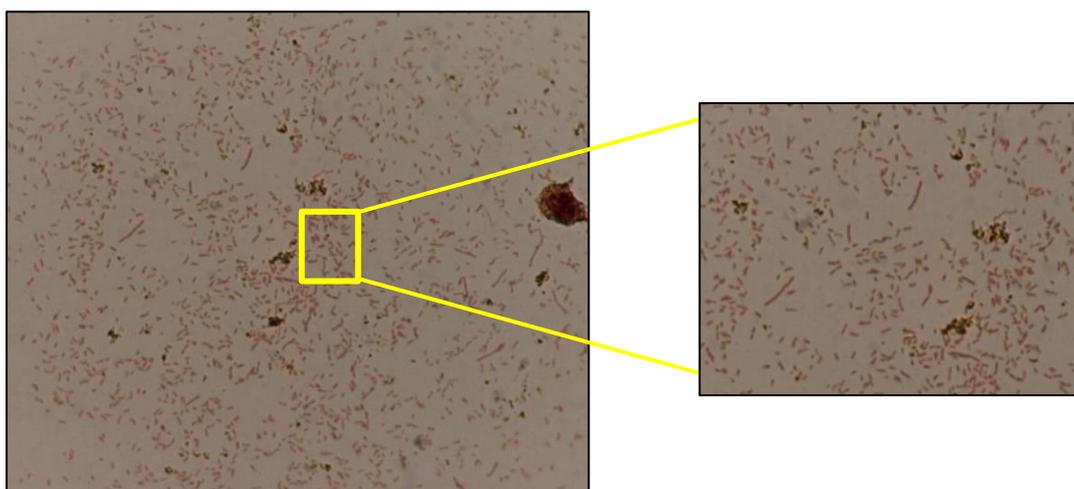


Figura. 3.7. Bacilos Gram negativos observados a 100X, pertenecientes a la Muestra 5.

Elaborado por: Gabriela González

3.1.6.2. Tamaño de los microorganismos de la Muestra 5 mediante el programa ImageJ.

En este software pudimos establecer las medidas de estas bacterias, dándonos así un área de $0.3 \mu\text{m}^2$ (Figura 3.8). Esta área se encuentra dentro del rango establecido para los géneros microbianos *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* (0.3 a $0.5 \mu\text{m}$ de ancho y longitud de 1 a $1.7 \mu\text{m}$) (Alegre, 1997; Rosales *et. al.*, 2001).

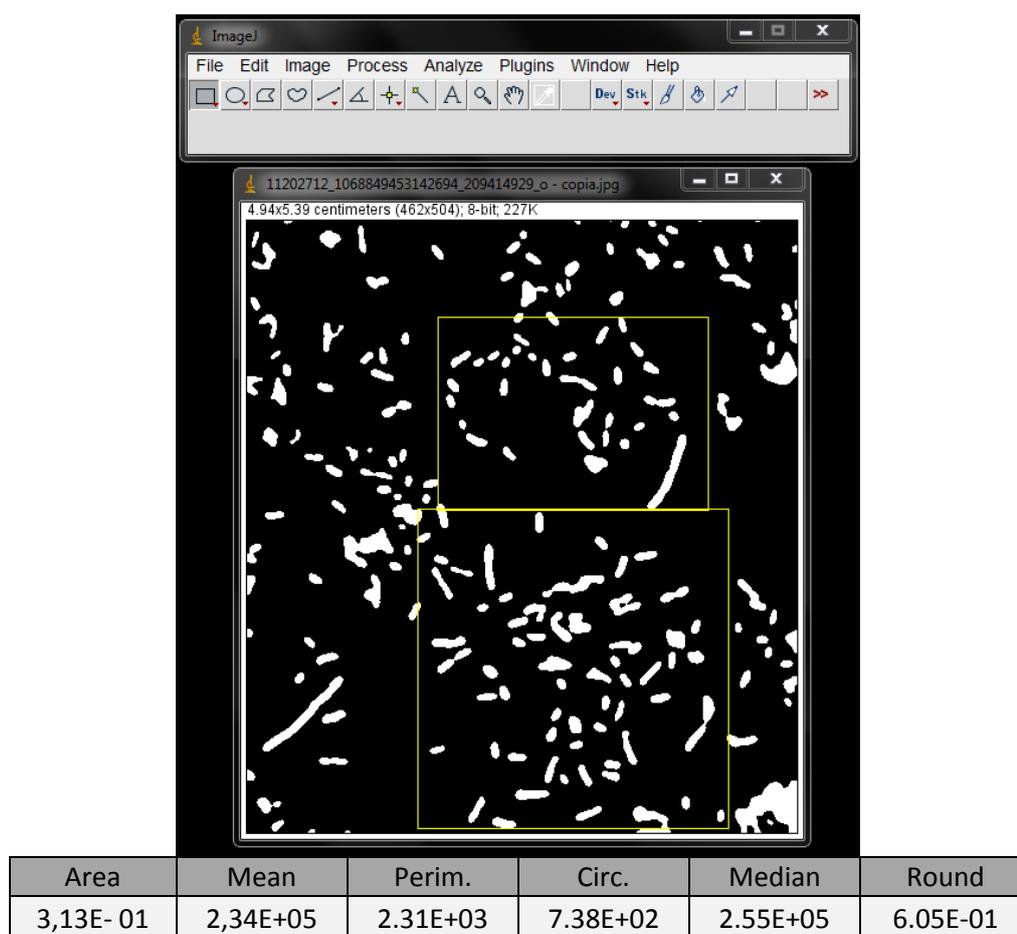


Figura 3.8. Área de los microorganismos presentes en la Muestra 5 obtenida en el programa ImageJ versión 1.45 k.

Fuente: ImageJ

Elaborado por: Gabriela González

La Tabla 3.4 muestra un resumen de las características morfológicas, bioquímicas y condiciones de crecimiento del consorcio microbiano (Muestra 5) en comparación con las encontradas en referencia.

Tabla 3.4. Características morfológicas, bioquímicas y condiciones de crecimiento del consorcio microbiano (Muestra5) aislado en medio de cultivo Silverman y Lundgren (1959).

CARACTERÍSTICAS	CONSORCIO AISLADO	REFERENCIA (Alegre, 1997; Mejía et al., 2014)
MORFOLOGÍA	Células pequeñas, bacilos cortos con área total de 0.3µm	Células pequeñas, bacilos cortos, 0.3 - 0.5 µm x 1 – 1.7 µm
MEDIO LÍQUIDO	Medio con Fe (II), cambia el color por oxidación de Fe ²⁺ a Fe ³⁺ . Cambio de color en medio puro y en presencia de pirita	Medio con Fe (II), cambia el color por oxidación de Fe ²⁺ a Fe ³⁺ . Cambio de color en medio puro y en presencia de pirita
TINCIÓN	Gram negativo	Gram negativo
NUTRICIÓN	Autótrofa	Autótrofa
PH	1.8	1.3 – 4.5
PRODUCCIÓN	Ácido sulfúrico	Ácido sulfúrico
RELACIÓN C/O	Aerobias	Aerobias
FUENTE DE ENERGÍA	Sulfato ferroso y pirita	Sulfato ferroso y pirita
MEDIO DE CULTIVO	9k o medio de Norris	9k o medio de Norris
TEMPERATURA	20°C	20 – 35°C

Elaborado por: Gabriela González

3.2. Biooxidación en un sistema por lote

El consorcio microbiano (Muestra 5) aislado fue empleado en medio 9K modificado a diferentes concentraciones de pulpa (5, 10, 15 y 20% p/v), esto con la finalidad de determinar a qué concentración de pulpa se da un mejor crecimiento microbiano y una mejor solubilización del mineral sulfurado.

3.2.2. Cinética de crecimiento microbiano.

La notación que se utilizó para representar la densidad de pulpa al 5% es (A), 10% (B), 5% (C) y finalmente al 20% p/v es (D).

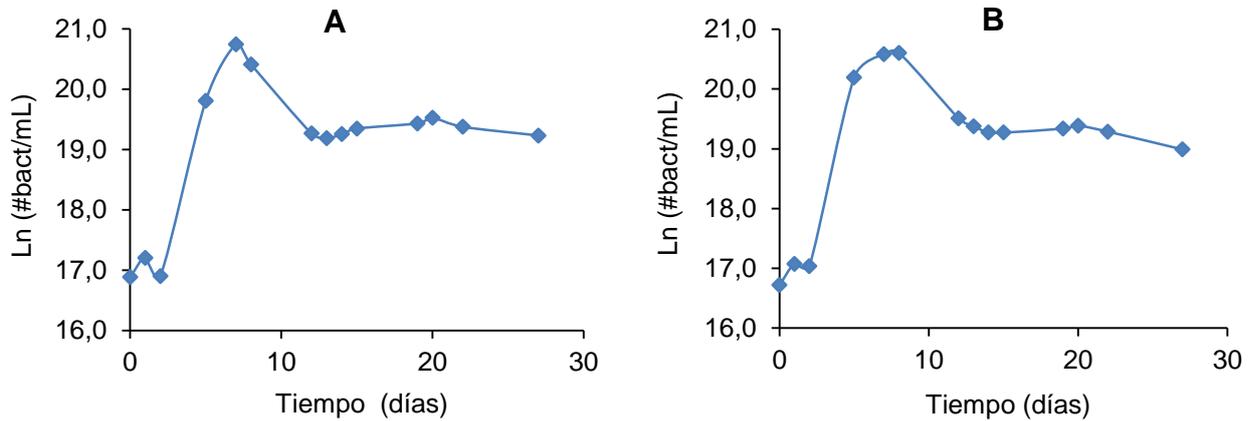


Figura 3.8. Cinética de crecimiento del consorcio microbiano con densidad de pulpa del 5% (A) (5%) y 10% (B) p/v.

Elaborado por: Gabriela González

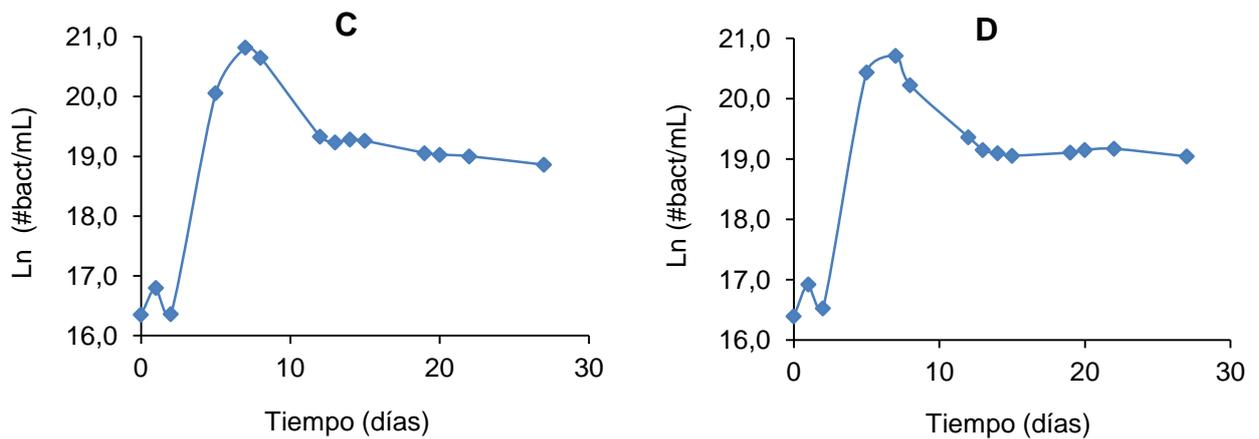


Figura 3.9. Cinética de crecimiento del consorcio microbiano con densidad de pulpa del C (15%) y D (20%) p/v.

Elaborado por: Gabriela González

En las Figuras 3.8 y 3.9 se observa el crecimiento del consorcio microbiano a diferentes densidades de pulpa. En todos los casos el crecimiento celular aumenta (fase exponencial) hasta el día 8 aproximadamente; a partir de esto existe una muerte celular acelerada, a las 10 horas el crecimiento bacteriano tienden a ser constante hasta el día 20 (etapa estacionaria) para todos los casos, y terminan con la etapa de muerte celular.

El crecimiento en los cuatro tipos de densidades de pulpa presentó un mejor comportamiento a los estudios realizados por Gordillo *et. al.*, (2004) que obtuvo crecimientos hasta $6(10)^7$ #bact/mL y Arroyave (2008) logró crecimiento de $5(10)^7$ #bact/mL, debido a la buena adaptación del consorcio microbiano (Muestra 5) en medio de cultivo de Silverman and Lundgren (1959) y en medio 9K modificado con mineral, es por ello que no se puede evidenciar la fase de latencia (Arroyave 2008). En (A) y (B) se logró crecimientos hasta $9(10)^8$ #bac/mL, mientras que en (C) y (D) se alcanzó $1(10)^9$ #bac/mL. Con esto se puede decir, que se tuvo un buen crecimiento bacteriano bajo las condiciones establecidas en este estudio que son granulometría, agitación, pH y potencian redox (Eh) y que recomienda Gordillo *et. al.*, (2004).

En las Figuras 3.8 y 3.9 (5, 15 y 20% p/v) se puede apreciar en el día dos una muerte celular, esto se produjo al rápido consumo de la fuente de energía ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) que conforma el medio de cultivo 9K modificado, lo cual indujo a que los microorganismos empleen el hierro proveniente y presente en el mineral como nueva fuente de energía, existiendo, posteriormente un aumento en la concentración celular (día 8). Además la baja concentración de microorganismo en el día dos se debió a la adherencia de los microorganismos a las partículas de mineral lo cual redujo el número de microorganismos en suspensión (Cárdenas *et. al.*, 2004; Acevedo *et. al.*, 2005).

En la Figura 3.10 se visualiza la velocidad máxima de crecimiento bacteriano μ (día^{-1}) para cada densidad de pulpa, en ellas se puede evidenciar que la velocidad específica de crecimiento obtenida fue de 0.784, 0.736, 0.918 y 0.874 día^{-1} para (A), (B), (C) y (D) siendo mayores a los alcanzadas por Alegre (1997) el cual obtuvo valores de μ_{max} aproximados a 0.250 día^{-1} a pH 1.8. Los altos valores alcanzados de velocidad de crecimiento a diferencia de los contrastados con la bibliografía son mayores debido al tipo de mineral utilizado en este estudio que presenta pirita en mayor porcentaje (Anexo 1), mientras que en Alegre (1997) el mineral contiene Arsénico el cual produce un efecto inhibitorio en los microorganismos.

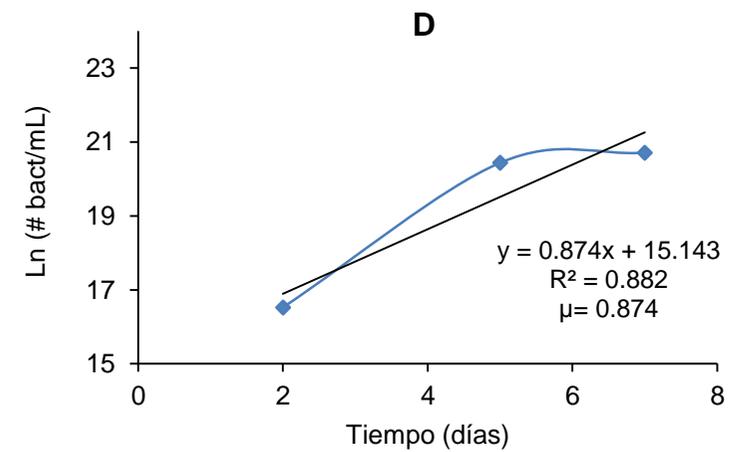
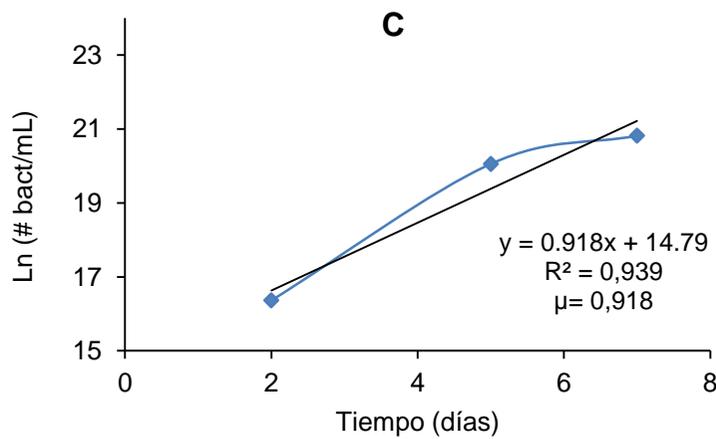
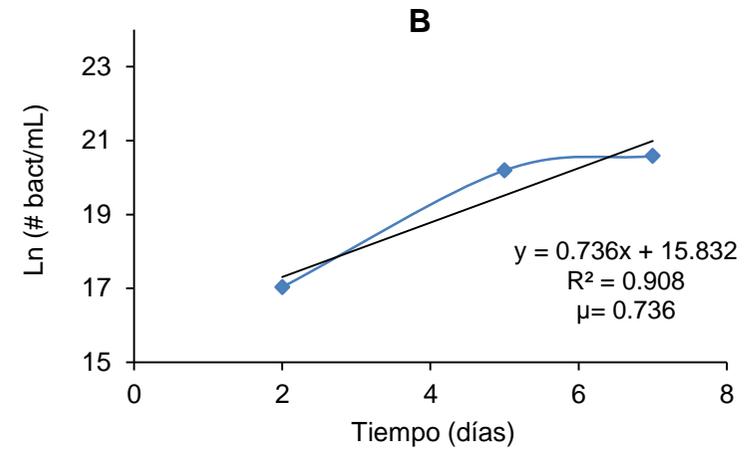
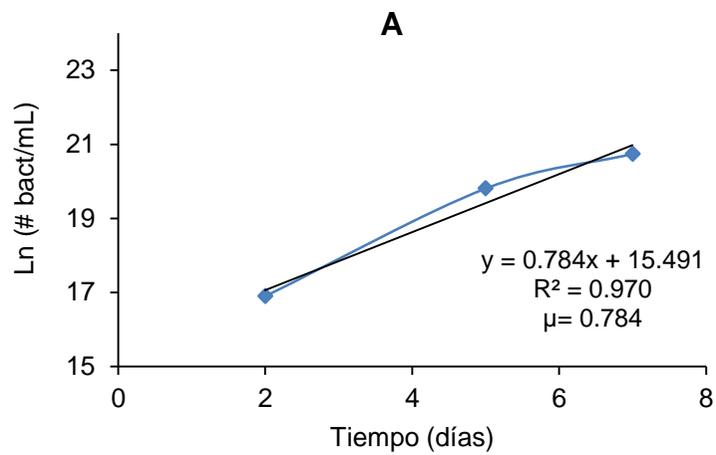


Figura 3.10. Velocidad de crecimiento del consorcio microbiano a diferentes densidades 5% (A), 10% (B), 15% (C) y 20% (D) de pulpa en un sistema por lotes.

Elaborado por: Gabriela González

3.2.3. Evaluación del proceso de biooxidación en reactor de tanque agitado.

En la Figura 3.11 se muestra la variación en la concentración de ión ferroso, ión férrico, hierro total y producción de sulfatos en solución durante el proceso por lotes, para las cuatro densidades de pulpa. A la par se ve un incremento en la concentración de ion férrico (Fe^{3+}) y disminución del ion ferroso (Fe^{2+}). Mientras que el ion sulfato presenta concentración 2 veces mayor que la de hierro total, debido a la degradación de la matriz mineral. Acevedo y Gentina (2005) indican que en el caso de la pirita por cada molécula de FeS_2 atacada, se da la formación de dos moléculas de sulfato.

Tabla 3.5. Concentraciones finales de ión férrico (Fe^{3+}) e ion sulfato (SO_4^{2-}) a diferentes densidades de pulpa en un sistema por lote.

Densidad de pulpa (% p/v)	Fe^{3+} (g/L)	SO_4^{2-} (g/L)
5	46.78	78.86
10	33.13	64.62
15	24.41	56.76
20	16.09	55.95

Elaborado por: Gabriela González

En la Tabla 3.5 se presentan las concentraciones finales de ion Fe^{3+} y SO_4^{2-} a diferentes densidades de pulpa, en ésta se aprecia que al final del proceso oxidativo tanto el ion férrico como sulfato disminuyeron a medida que aumentó la densidad de pulpa. Al 5% (p/v) se alcanzó las mayores concentración de Fe^{3+} y SO_4^{2-} seguido de 10, 15 y 20% (p/v), es decir, se da mejor solubilización del mineral refractario al 5% p/v; esto en un tiempo aproximado fue de 20 días.

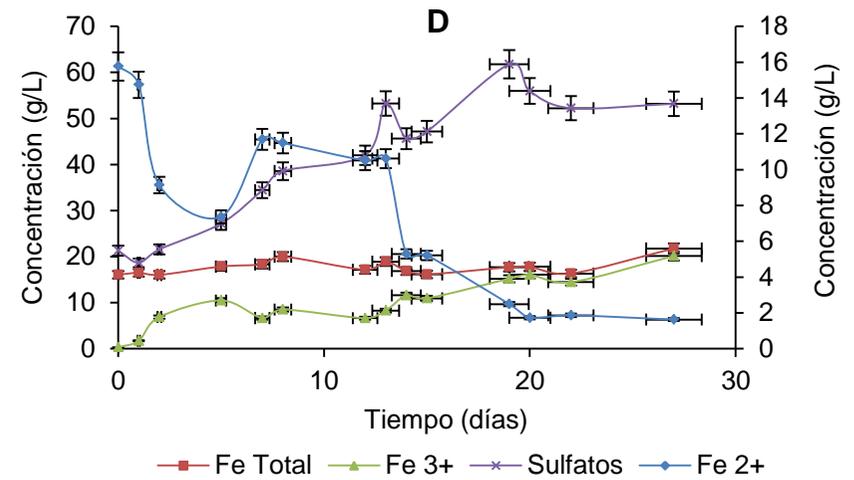
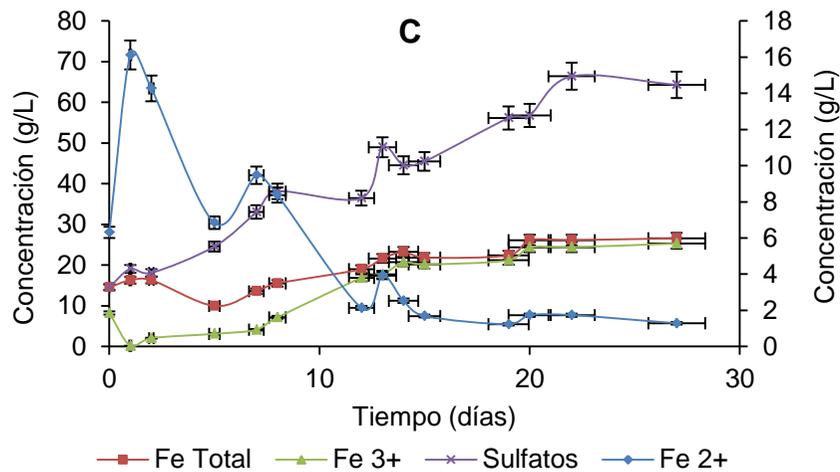
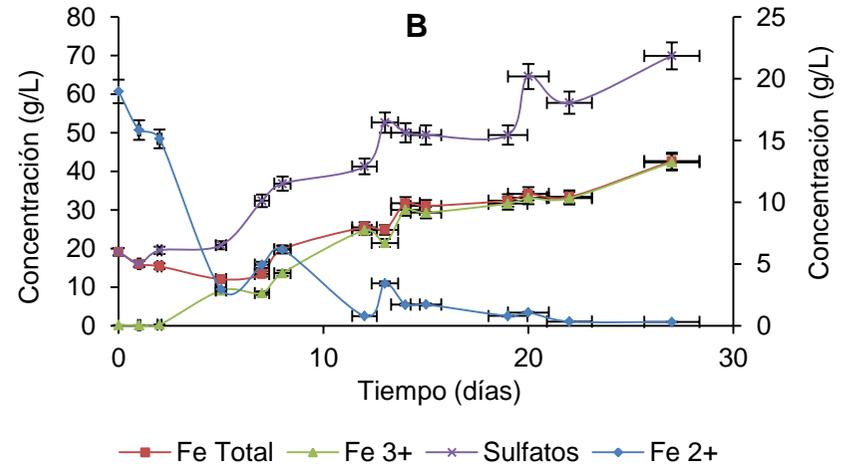
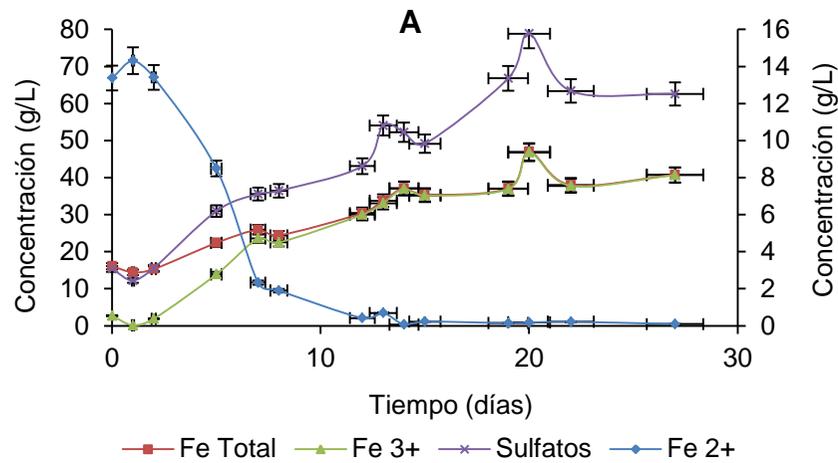


Figura 3.11. Variación de la concentración de Fe total, Fe³⁺ y sulfatos (eje primario) y Fe²⁺ (eje secundario) a densidad de pulpa del 5, 10, 15, 20 % (p/v) en un sistema por lotes.

Elaborado por: Gabriela González

3.2.4. Productividad volumétrica de ion férrico y sulfatos.

La Figura 3.14 indica la productividad volumétrica de ion férrico ($Q_p \text{ Fe}^{3+}$, g/L día) e ion sulfato ($Q_p \text{ SO}_4^{2-}$, g/L día) alcanzadas a diferentes densidades de pulpa en un tiempo de 20 días. Se puede observar que a la densidad de pulpa al 5% p/v se obtuvo mayor productividad de ión férrico y sulfatos. Mientras que al aumentar la densidad la productividad volumétrica alcanzada de ion férrico y sulfato fue menor. Mejía (2010) reporta que a mayor porcentaje de sólidos hay menor cantidad de oxígeno para las bacterias durante el proceso, lo cual puede ocasionar daño en la pared celular dando como consecuencia la fricción entre los microorganismos y las partículas del mineral, es por eso las bajas productividades alcanzadas en este estudio.

Por otro lado, se obtuvo porcentajes de hierro extraído de 62.860, 20.328, 5.946 y 1.524 para el 5, 10, 15 y 20% p/v respectivamente. Esto confirma que al aumentar la densidad de pulpa el porcentaje de hierro extraído disminuye. Canales *et. al.*, (2003) indica que obtuvo el 50% de hierro extraído en un tiempo de residencia de 10 días, siendo este resultado menor al obtenido en este trabajo el cual fue 62.86% de hierro extraído al 5% p/v y en un tiempo 20 días.

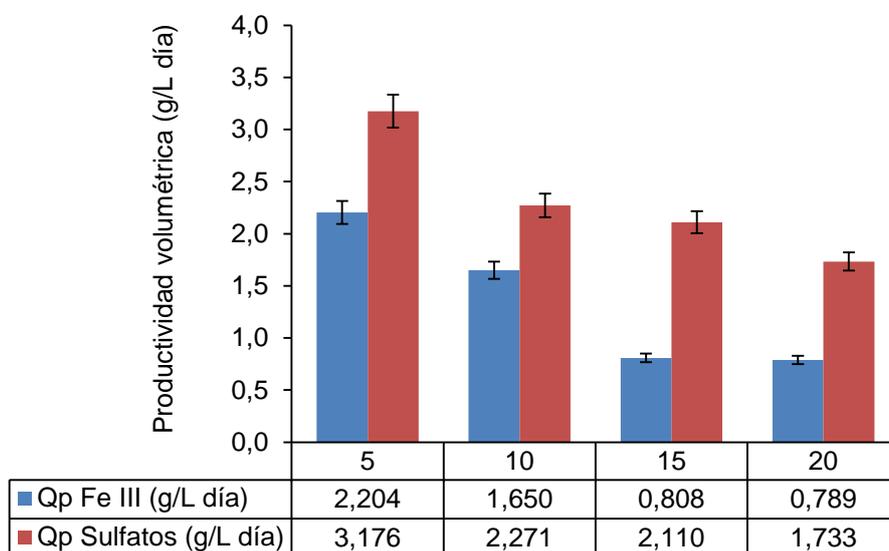


Figura 3.14. Comparación de las variables $Q_p \text{ Fe}^{3+}$ y $Q_p \text{ SO}_4^{2-}$ con respecto a la densidad de pulpa (5, 10, 15 y 20% p/v) para la solubilización del mineral refractario.

Elabora por: Gabriela González

Se ha demostrado que utilizando del 0 al 15% de sólidos la velocidad de solubilización del mineral refractario será directamente proporcional a la concentración de sólidos, mientras que si se utiliza del 15 al 20% de sólidos la velocidad de solubilización será independiente de la concentración de sólidos, por ende al aumentar la densidad de pulpa disminuye la concentración de bacterias adheridas al sólido y se da una saturación o efecto inhibitorio, motivo que provoca disminución en la concentración de sulfatos (González, 1999).

Según Mejía (2010) es importante adaptar el consorcio microbiano al mineral, es decir, realizar cultivos sucesivos en los cuales se incrementa poco a poco el porcentaje de sólidos, con el fin de mejorar las productividades, porcentajes de hierro extraído e incluso rendimientos de oro, trabajando hasta una densidad de pulpa del 20% p/v a la par con esto se logra que las bacterias crezcan a expensas de la disolución del mineral.

3.2.5. Análisis estadístico para las diferentes densidades de pulpa.

En el Anexo 9 y 10 se presenta las comparaciones múltiples para cada variable de respuesta ($Q_p \text{ Fe}^{3+}$ y $Q_p \text{ SO}_4^{2-}$) del sistema por lotes respecto a la densidad de pulpa (5, 10, 15 y 20% p/v).

Se aplicó un análisis de varianza de un factor con la finalidad de comparar varios grupos (densidad de pulpa 5, 10, 15 y 20% p/v) en una variable cuantitativa. Esta prueba fue usada con el objetivo de contrastar la igualdad de medias entre los grupos y con distribución normal.

Tabla 3.5. Descriptivos estadísticos de la variable de respuesta Qp Fe³⁺ y Qp SO₄²⁻ para cada densidad de pulpa en un sistema por lote de biooxidación.

Variables de respuesta	% (P/V)	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Qp Fe ³⁺ (g/L día)	5	3	2.332	0.067	0.038	2.164	2.499	2.26	2.38
	10	3	1.665	0.088	0.051	1.445	1.885	1.58	1.76
	15	3	0.824	0.032	0.018	0.744	0.904	0.79	0.85
	20	3	0.804	0.031	0.017	0.728	0.880	0.78	0.84
	Total	12	1.406	0.668	0.192	0.982	1.830	0.78	2.38
Qp SO ₄ ²⁻ (g/L día)	5	3	3.333	0.135	0.078	2.996	3.669	3.22	3.48
	10	3	2.326	0.157	0.091	1.935	2.716	2.17	2.49
	15	3	2.164	0.157	0.091	1.774	2.554	1.98	2.26
	20	3	1.788	0.191	0.110	1.313	2.262	1.57	1.92
	Total	12	2.403	0.612	0.177	2.013	2.792	1.57	3.48

Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 20

Elaborado por: Gabriela González

En la Tabla 3.5 denominada descriptivos, se analizó la variable densidad de pulpa con respecto a la variable productividad volumétrica de ion férrico (Qp Fe³⁺), ion sulfato (Qp SO₄²⁻), en ella se percibe las medias de los cuatro grupos (%p/v) así como sus respectivas desviaciones típicas.

La media más baja es de 0.8043 (20% p/v) mientras que la media alta es de 2.3320 (5% p/v) esto para Qp Fe³⁺; mientras que para Qp SO₄²⁻ se observa que la media alta es de 3.333 (5% p/v) y la media baja es de 1.788 (20% p/v). A partir de estas medias se pudo analizar la varianza, es decir, si existe diferencia entre grupos.

Por otro lado, se aplicó la prueba de hipótesis para comparar más de dos muestras basado en el análisis ANOVA de un factor. Se tomó como variable independiente la densidad de pulpa (5, 10, 15 y 20% p/v), y como variable respuesta la productividad volumétrica de Fe³⁺ y SO₄²⁻ (g/L día).

Las hipótesis planteadas en esta investigación para este análisis ANOVA de un factor fueron:

H₀: La densidad de pulpa no influye en la productividad volumétrica obtenida en el proceso de biooxidación.

H₁: La densidad de pulpa influye en la productividad volumétrica obtenida en el proceso de biooxidación.

La prueba de hipótesis para comparar más de dos muestras fundadas en el análisis ANOVA de un factor se emplea con la finalidad de comparar la variabilidad de medias que hay entre las densidades de pulpa y se basa en el valor de significancia.

Tabla 3.6. ANOVA de un factor respecto a Qp Fe³⁺, Qp SO₄²⁻ para un proceso de biooxidación por lote.

VARIABLES DE RESPUESTA	Tipo de grupo	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Qp Fe ³⁺ (g/L día)	Inter-grupos	4.876	3	1.625	453.44	0.000
	Intra-grupos	0.029	8	0.004		
	Total	4.905	11			
Qp SO ₄ ²⁻ , (g/L día)	Inter-grupos	3.920	3	1.307	50.17	0.000
	Intra-grupos	0.208	8	0.026		
	Total	4.128	11			

Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 20

Elaborado por: Gabriela González

En la Tabla 3.6 del análisis ANOVA la F indica el cociente entre la media cuadrática Inter-grupos sobre la media cuadrática Intra-grupos resultando 453.44 para Qp Fe³⁺ (g/L día) y 50.17 Qp SO₄²⁻ (g/L día) con una significancia de 0.000, para ambos casos. Claramente muestra que existe diferencia significativa entre los grupos (5, 10, 15, 20% p/v).

De acuerdo a la Tabla 3.6 los niveles de significancia son menores a 0.05, por lo que la hipótesis nula (H₀) se la rechaza y se acepta la alternativa (H₁), lo cual indica que la densidad de pulpa influye en la productividad volumétrica obtenida en el proceso de biooxidación.

3.2.6. Análisis del pH y potencial redox (Eh).

Uno de los factores que se controla durante el proceso es la formación de jarosita. Razón por lo cual fue importante controlar el pH (1.8 - 2) y Eh. A valores altos de pH surge la formación de precipitados férricos en forma de jarositas el cual juega un papel importante en la disminución de la actividad oxidativa de los microorganismos. El control de pH provocó que la magnitud en la precipitación de jarosita tendiera a reducir durante los primeros días y no fuera tan alta al final, como lo sugieren Gómez y Cantero (2003).

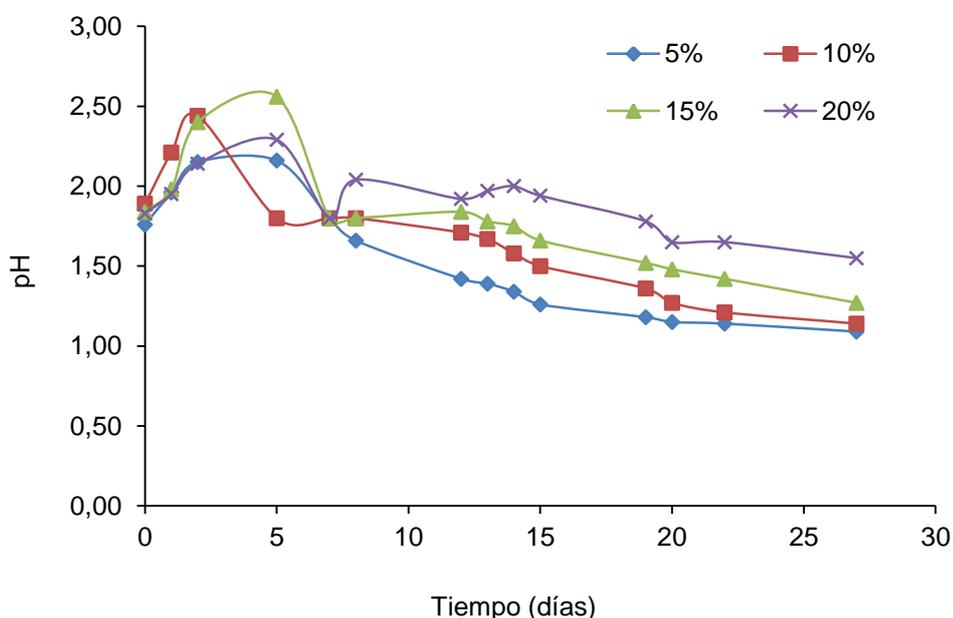


Figura 3.12. Variación de pH en el proceso de biooxidación en un sistema por lote a diferentes densidades de pulpa (A, B, C y D % p/v).

Elaborado por: Gabriela González

Los resultados obtenidos en esta experiencia lote se aprecia una disminución de pH y el potencial redox (Eh) crece en forma progresiva a medida que el ion ferroso es oxidado, mostrando cambios en la relación Fe^{3+}/Fe^{2+} esto se debe al incremento de las concentraciones de ion férrico generado en el medio (Meruane *et. al.*, 2003; Muñoz *et. al.*, 2003), esto se puede ver en las Figuras 3.12 y 3.13. El proceso a las diferentes densidades de pulpa partió de un pH 1.8 y llegó hasta valores de pH 1.09, 1.14, 1.27 y 1.55 para 5, 10, 15 y 20% p/v disminución que se debe al ácido sulfúrico, producido por el metabolismo bacteriano al emplear el azufre contenido en el mineral.

La disminución también se puede atribuir a la oxidación selectiva de compuestos reducidos de azufre hasta sulfatos, por medio de una serie de reacciones intermedias, donde este ácido es uno de los principales productos finales (Rossi, 1990; Muñoz *et. al.*, 2003).

En general, todos los cultivos presentan un incremento inicial de pH en los primeros 5 días, el cual podría ser porque durante este período se reajusta el metabolismo de los microorganismos a las condiciones de medio ambiente (Cardona, 2009) y debido a que en esta etapa existe una acción buffer de los exopolisacaridos celulares en la superficie del mineral (Jaramillo, 2014).

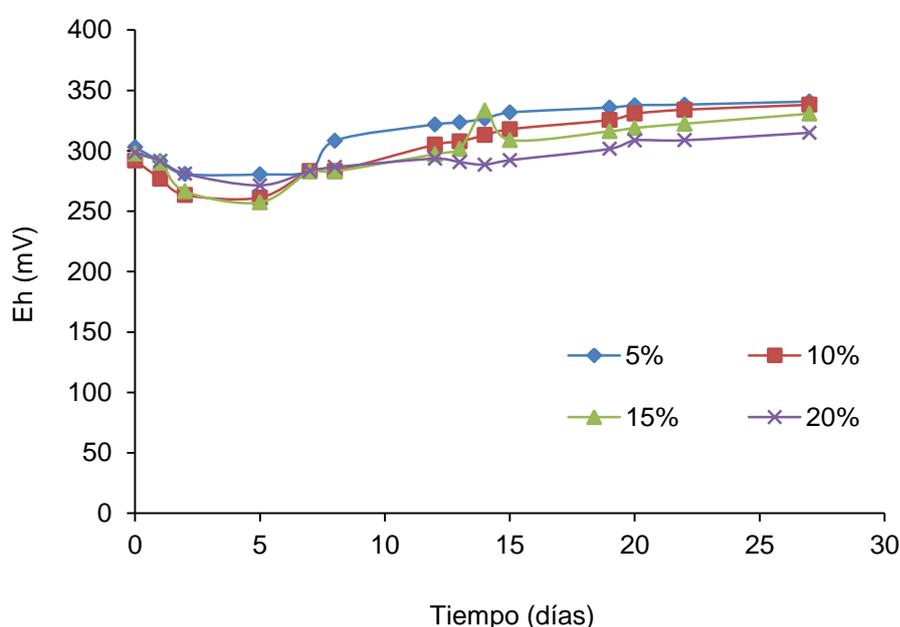


Figura 3.13. Variación de potencial redox (Eh) en el proceso de biooxidación en un sistema por lote a diferentes densidades de pulpa (5, 10, 15 y 20 % p/v).

Elaborado por: Gabriela González

Por otro lado el máximo potencial redox (Eh) obtenido fue de 340.8 mV, 338.0 mV, 330.7 mV, y 314.9 mV para 5, 10, 15, 20% p/v estos valores son similares entre sí, es decir, no existe diferencias significativas. El potencial redox tienden a disminuir durante los 5 primeros días esto se debe, a que el Eh tiene un comportamiento inversamente proporcional al pH. A partir de esto el proceso se activa y la tendencia incrementa. Estos resultados son análogos a los alcanzados por Díaz (2012) donde se obtuvo valores máximos de Eh de 315mV en un 15% de densidad de pulpa y 20% de inóculo.

Los bajos valores de Eh en esta investigación pueden ser sustentados con lo que reporta Blight *et. al.*, (2000), lo cual dice, los valores de potencial redox no son tan altos debido a la posible precipitación de hierro la cual disminuye las concentraciones de ion férrico en solución, también afirma que esto sucede debido a la disminución de la oxidación bacteriana de ion ferroso por inhibición. A la par puede ser provocado porque la concentración de ion férrico a esos valores de potencial redox (Eh) fue suficientemente inhibitoria para el consorcio microbiano, especialmente cuando se utiliza reactores en sistema por lotes, como lo explica Muñoz (2003). Arroyave (2010) explica que para evitar la gran formación de jarosita es oportuno trabajar en modo continuo debido a la salida continua de Fe^{3+} y algo de jarosita. Se puede observar que este comportamiento tiene relación a lo mencionado por Chang *et. al.*, (1982) sobre la disminución de potencial redox a medida que aumenta el área superficial de la pirita.

Es importante mencionar que durante el proceso oxidativo se controló el pH (menor a 1.8) con el fin de reducir la formación de jarosita, ya que es un compuesto cianicida insoluble que actúa cubriendo las partículas de mineral e impide que el oro sea atacado por el cianuro en el tratamiento final de extracción por cianuración.

3.2.7. Cianuración del mineral biooxidado.

Los ensayos de cianuración se realizaron para cuantificar la extracción de oro después del proceso de biooxidación. En la Tabla 3.7 se aprecia los gastos totales tanto de cianuro como de cal para cada densidad de pulpa. En los casos 5% p/v (A), 10% p/v (B), 15% p/v (C) y 20% p/v (D) se utilizaron las mismas condiciones de operación (Anexo 9). La solución final fue leída por absorción atómica para determinar la ley de oro.

Tabla 3.7. Gasto de cianuro (CN⁻) y cal durante la cianuración.

Muestras	CN total (g)	Cal total (g)
(A)	1.210	0.220
(B)	1.661	0.309
(C)	2.469	0.188
(D)	3.041	0.160

Elaborado por: Gabriela González

3.2.8. Balance metalúrgico y rendimiento de oro.

Finalmente se realizó ensayos de fundición-copelación con el fin de determinar la ley de oro (Au) del relave de cianuración. Estos resultados se utilizaron para calcular los balances metalúrgicos correspondientes a las diferentes densidades de pulpa.

En la Figura 3.15 se presenta el porcentaje de recuperación de oro a diferentes densidades de pulpa, se comprueba que el mayor porcentaje de Au recuperado se dio a la densidad de pulpa del 5%, alcanzando aproximadamente un 51%.

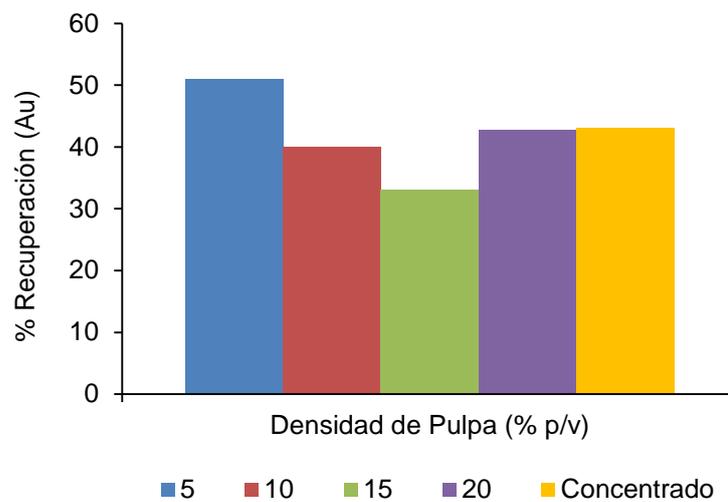


Figura 3.15. Porcentaje de recuperación de oro (Au) para cada densidad de pulpa evaluado en un sistema por lotes.

Fuente: Gabriela González

Se puede observar que se recuperó un 43% de Au en el mineral concentrado (mineral sin biooxidar) mientras que en el mineral biooxidado se recupera aproximadamente 10% más de oro. La baja recuperación puede deberse al deficiente lavado del mineral previo a la cianuración, lo cual hace que no se elimine completamente la poca jarosita formada. Arias *et. al.*, (2005) indica que uno de los factores que influye en la baja extracción de oro después de la cianuración es debido a la falta de oxidación de la pirita.

CONCLUSIONES

- A partir de aguas, lodos y sedimentos ácidos del yacimiento minero San Vicente se aisló un consorcio microbiano utilizando un medio de cultivo específico para bacterias acidófilas con sulfato ferroso ($\text{FeSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) como fuente de energía. Posiblemente este consorcio este formado por los géneros *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* de acuerdo al tamaño y morfología de los microorganismos obtenidos a condiciones óptimas de crecimiento de pH 1.8 y temperatura de 20°C.
- En el sistema por lote de biooxidación se determinó que operando a una densidad de pulpa del 5% p/v se obtuvo la mayor solubilización del mineral aurífero logrando una productividad volumétrica $Q_p \text{Fe}^{3+}$ de 2.204, Q_p sulfatos de 3.176 con una velocidad de crecimiento de 0.784 días⁻¹ y un porcentaje de recuperación de oro (Au) del 51% aproximadamente esto en un tiempo de 20 días.
- Es posible tratar por el proceso de biooxidación al mineral del yacimiento San Vicente debido a la presencia de pirita (FeS_2) indicando que puede ser un mineral con oro refractario.

RECOMENDACIONES

- Hacer un estudio profundo tanto al mineral de cabeza como al mineral biooxidado por microscopía óptica de luz plana polarizada, esto con la finalidad de ver la composición más exacta en el mineral de cabeza y poder ver el nivel de oxidación de los sulfuros y el crecimiento de aglomerados en las muestras biooxidadas. Ya que así tendríamos un mejor conocimiento del comportamiento del sistema.
- Realizar la caracterización molecular a este consorcio microbiano aislado para comprobar la presencia de las bacterias de género *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* y determinar otro tipo de microorganismos puedan estar presentes en el inóculo.
- Durante el proceso de biooxidación es necesario controlar el pH, es decir que no sea mayor a 2.5 para evitar la formación de precipitados en forma de jarosita.
- Es necesario someter el mineral a un proceso de lavado con agua acidulada (pH 1.8) previo al proceso de cianuración, luego subir el pH paulatinamente lo cual ayuda a disminuir la pasivación del mineral de esta manera aumentar la recuperación de oro.
- Se debe realizar estudios donde se escale este proceso de biooxidación a un sistema continuo, y luego hacerlo en escala piloto.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo F. y Gentina J. (2005). Mecanismos de la biolixiviación, Fundamentos y perspectivas de las Tecnologías Biomineras. Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso.
- Aguirre, P; Díaz, E; Gentina, J. (20013). Adv. Mater. Res. 825, 364-367.
- Akcil, A. (2004). Potencial bioleaching developments towards comercial reality: Turkish metal mining's future. Minerals Engineering. 17, 477- 480.
- Alegre, C. (1997). Biooxidación de concentrados refractarios de oro en tanques agitados. Tesis de Maestría, Universidad católica de Valparaíso, Chile.
- Argelia, A. (2004). Biolixiviación de minerales sulfuro-ferroso en jales: aislamiento y caracterización de cultivos puros y mixtos de microorganismos involucrados. Tesis de Doctorado, Universidad de Colima, México.
- Arias V; Rosa C, Luis P. (2005). Refractariedad de Concentrados auríferos. *Rev. Inst. investig. Fac. minas metal cienc. Geogr.* 8, 16, 5-14.
- Arroyave, D. (2008). Evaluación del proceso de biooxidación a escala de laboratorio del mineral aurífero de la mina el Zancudo, Titiribí, Antioquia. Tesis de Maestría, Universidad Nacional De Colombia. Colombia.
- Arroyave D; Márquez M; Gallego D; Pacheco G. (2010). Evaluación y caracterización mineralógica del proceso de biooxidación en un reactor continuo de tanque agitado. *Dyna.* 77, 164, 18-28,
- Ballester, A. (2005). Mecanismos de Biolixiviación. En Acevedo F. y Gentina J, Fundamentos y Perspectivas de las Tecnologías Biomineras. Chile - Valparaíso.
- Benito, J., García A., Trebolazabala J., Vázquez R., Zalbidegoitia, E. (2013). Tinción de Gram y tira reactiva como métodos diagnósticos de la infección del tracto urinario del lactante con fiebre. *Anales de Pediatría*, 53: 561-566.

- Blight K., Ralph D.E., Thurgate S. (2000). Pyrite surfaces after bio-leaching: a mechanism for biooxidation. *Hydrometallurgy*. 58, 227- 237.
- Canales, C; Gentina, J; Acevedo, F. (2003). *Int. Biohydrometall. Symp.* 15, 185-192.
- Cárdenas, J; Guerrero, J; Zárate, G. Mecanismos de oxidación bacterial de minerales sulfurados. <http://www.solomineria.com.pe/html/metalurgia/57.pdf> (consultado 01 Enero de 2015).
- Cardona I. C. & Márquez M. A. (2009). Bidesulfurization of two Colombian coals with native microorganisms. *Fuel Process. Technol.* 82, 95-105.
- Chang, Y. & Myerson, A. (1982). Growth models of the continuous bacterial leaching of iron pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol.* 24, 889-902.
- Colmer, A; Hinkle, M. (1950). The Role of Microorganisms in Acid Mine Drainage: Preliminary Report. Agricultural y Engineering Experiment Stations, West Virginia University.
- Cuevas, R. (2013). Ingeniería de reactores. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Balancemateria_10657.pdf (consultado 01 de Enero de 2015).
- Deveci, H. (2004). Effect of particle size and shape of solids on the viability of acidophilic bacteria during mixing in stirred tank reactors. *Hydrometallurgy*. 71, 385-396.
- Díaz, E. (2012). Optimización de parámetros para la biooxidación de minerales polimetálicos del distrito minero Portovelo. Tesis de Ingeniería Química. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Donati E. (2006). Biominería: Una tecnología alternativa. <http://www.voces.antahualan.com.ar/edi11.html>. (Consultado 01 de Enero del 2015).
- Dresher. W. (2004). Cooper Applications in Mining and Extraction.

http://www.copper.org/innovations/2004/05/producing_copper_natures_way_bi_oleaching.html. (Consultado 01 de Enero de 20015).

Gómez, J. y Cantero, D. (2005). Biooxidación del ión ferroso. Fundamentos y Perspectivas de las Tecnologías Biomineras. 25-43.

Gonzaga, L. (2005). Cianuración por agitación para la disolución de oro de las menas de Ponce Enríquez. (Consultado 01 de Enero del 2015) <http://ebookdig.biz/view/ebook.g>

González, R. (1999). Biooxidación de un mineral concentrado refractario de oro en sistema continuo. Tesis de Maestría .Universidad católica de Valparaíso, Chile.

González, R; Gentina, J; Acevedo, F. (2003). Electron. J. Biotechnol. 6, 233-243.

González R, Gentina J, Acevedo F. (2004). Biooxidation of a gold concentrate in a continuous stirred tank reactor: mathematical model and optimal configuration. Biochemical Engineering Journal. 19, 33-42.

Gordillo, F; Sanmartín, V; Toracchi, E; Carrión, F. (2004). Congreso Internacional de Minería, Metalurgia y Materiales. 3.

Hansford, G. & Chapman, J. (1992). Batch and continuous Biooxidation Kinetics of a Refractory Gold-Bearing Pyrite Concentrate. 5. 597-612.

Harneit, K; Goeksel, A; Kock, D; Klock, J; Gehrke, T; Sand, W. (2006). Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*. Hydrometallurgy. 83, 245–254.

Herrera, L; Agillon, JC; Fehrmann, A. (1989). A new spectrophotometric method for the determination of ferrous iron in the presence of ferric iron. Chem Technol Biotechnol 44, 171

Jaramillo, K. (2014). Influencia del tiempo de residencia sobre la solubilización de un mineral aurífero refractario del distrito minero Portovelo en un sistema continuo de biooxidación en reactores de tanque agitado a escala laboratorio. Tesis de Ingeniería Química. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.

- Jensen, A; Webb, D. (1995). Ferrous Sulphate Oxidation Using Acidithiobacillus ferrooxidans: a Review, Process Biochemistry. 225-236.
- Kelly, D. & Wood, A. 2000. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designate genera *Acidithiobacillus* gen. 50, 511-516.
- Lacey, D & Lawson, F. (1970). Kinetics of liquid-phase oxidation of acid ferrous sulfate by the bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. Biotechnol. Bioeng. 29-50.
- Ludeña, R. (2012). Estudio Hidrometalúrgico por Cianuración de los concentrados de Flotación de los relaves provenientes de la minería artesanal del yacimiento Nambija. Tesis de Ingeniería Química. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Mejía, E. (2010). Mineralogía del proceso de lixiviación bacteriana de calcopirita (CuFeS₂), esfalerita (ZnS) y galena (PbS). Tesis de Maestría, Universidad Nacional De Colombia, Colombia.
- Mejía, E; Osorno L; Ospina J. (2014). Microorganismos Hierro-Azufre Oxidantes Una Alternativa Biotecnológica. Revista CINTEX. Institución Universitaria Pascual Bravo, 19, 63-77
- Meruane, G. and Vargas, T. (2003). Bacterial oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the pH 2.5-7.0. Hidrometallurgy, 71, 149-158.
- Muñoz, A. (2002). Oxidación de concentrados de sulfuros metálicos provenientes de la mina La Maruja de Marmato, Caldas, mediante una cepa nativa de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Tesis de Maestría en Biotecnología.
- Muñoz, A; Márquez, M; Montoya, O; Ruiz, O. (2003) Iemehsko, V. Rev. Colomb. Biotecnol. 5, 73-81.
- Muzzio, T. (2002). Cinética de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en un medio definido con sulfato ferroso como fuente de energía. Tesis de Maestría, Chile-Valparaíso.
- Ospina, J; Mejía, E; Osorno, L; Márquez, M; Morales, A. (2012). Rev. Colomb. Biotecnol. 14, 135-145.

Rosales, V; Guerrero, J; Sáez, M. Industrial. 2001, 2, 7-10.

Rossi, G. (1990). Biohydrometallurgy; McGraw- Hill Book Company GmbH: Hamburgo.

Rossi G. (2001). The design of bioreactors. Hidrometallurgy. 59, 217-231.

Sánchez, I. (2013). Diversidad microbiana y taxonomía: Crecimiento microbiano. Enlace disponible en:

http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=182&Itemid=225 (consultado 5 de Enero de 2015).

Sand, W; Gehrke, T; Asai, S. (2001). (Bio) chemistry of bacterial leaching- direct vs. indirect bioleaching. Hydrometallurgy. 59, 159-175

Sand, W., Gehrke, T., Hallmann, R., Schippers, A. (1995). Sulfur chemistry, biofilm, and the (in) direct attack mechanism critical evaluation of bacterial leaching. Applied Microbiology and Biotechnology. 43, 961–966.

Silverman, M. and Lundgren, D. (1959). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. An improved medium and a harvesting procedure for secure high cell yields. J. Bacterial. 77, 642-647.

Schippers, A. and Sand, W. (1999). Bacterial Leaching of Metal Sulfides Proceeds by Two Indirect Mechanisms via Thiosulfate or via Polysulfides and Sulfur. Applied And Environmental Microbiology. 65, 319–321.

Velásquez, A. (2014). Aislamiento, Identificación y Caracterización molecular de microorganismos termófilos (*Sulfolobus metallicus*) aplicados en biominería. Tesis de Bioquímica y Farmacia. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.

ANEXOS

ANEXO 1.- PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR LA TINCIÓN GRAM

Primero se siembra la muestra en porta objetos y se realiza las siguientes tinciones:

- **Colorante 1 Violeta Cristal**

Colocar unas 3 gotas de Violeta Cristal sobre las placas con muestra y esperar 1.25 minutos. Lavar con el agua destilada desde la parte posterior del portaobjetos con el fin de no perder la muestra.

- **Colorante 2: Lugol.**

Seguidamente se coloca la solución del Lugol, 3 gotas y esperar 1.25 minutos. Lavar con agua destilada.

- **Colorante 5: Alcohol Cetona.**

Esta solución saca el exceso de colorante. Se deja un 1min para que reaccione y luego se escurre.

- **Colorante 4: Safranina.**

Esta solución se coloca por 35 segundos y se lava con agua destilada. Finalmente las muestras coloreadas con observadas en el microscopio.

ANEXO 2.- CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y MINERALÓGICA DEL MINERAL DE CABEZA SAN VICENTE

Tabla 2.1. Análisis químico de cabeza

Metal	g/ton
Oro (Au)	2.70
Plata (Ag)	48.67

Fuente: Laboratorio de Metalurgia extractiva de la UTPL

Elaborado por: Gabriela González

Tabla 2.2. Análisis químico de concentrado

Metal	g/ton
Oro (Au)	5.10
Plata (Ag)	59.10

Fuente: Laboratorio de Metalurgia extractiva de la UTPL

Elaborado por: Gabriela González

Tabla 2.3. Análisis químico de cabeza

Metal	g/ton
Oro (Au)	1.20
Plata (Ag)	46.20

Fuente: Ensayos al fuego DMEX

Elaborado por: Gabriela González

Tabla 2.4. Análisis mineralógico de cabeza por difracción de rayos X.

Mineral	Fórmula	Contenido (%)
Grupo plagioclasa (Albita)	$(\text{Na,Ca})\text{Al}(\text{Si,Al})\text{Si}_2\text{O}_8$	7
Cuarzo	SiO_2	60
Caolinita	$\text{Al}_2(\text{Si}_2\text{O}_5)(\text{OH})_4$	2
Muscovita	$\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_2$	8
Pirita	FeS_2	23

Fuente: Escuela Politécnica Nacional-Departamento de Metalurgia extractiva (DMEX)

Elaborado por: Gabriela González

ANEXO 3.- DETERMINACIÓN DE ORO MEDIANTE ENSAYO AL FUEGO

Para la determinación de oro total presente en el mineral se requirió de un ensayo al fuego para ello se tiene que seguir el siguiente procedimiento:

- La muestra a analizar tiene que estar seca.
- Clasificación del mineral (Tabla 3.1)
- Homogeneización y cuarteo de la muestra mineral, con el fin de obtener resultados más exactos.
- Preparación de 75gr de carga fundente (Tabla 3.2), conjuntamente con un oxidante o reductor según el tipo de mineral a utilizar y colocarla en un crisol.
- Colocar 1mL de nitrato de plata (AgNO_3 – 6.3 g/L).
- Cubrir la superficie de la muestra con bórax.
- Fundir en una mufla la muestra a 1000°C durante 40 minutos.
- Calentar la lingotera.
- Luego de una fluidización se retira el crisol del horno y se vierte la solución en la lingotera previamente calentada.
- Enfriar a temperatura ambiente hasta que se solidifique.
- Esperar a que se enfrié la muestra y separar la fase metálica de la escoria para obtener el régulo de plomo (con un martillo dar forma cúbica).
- Calentar la copela en la mufla durante 20 minutos a 300°C aproximadamente.
- Copelar en la mufla a 900°C el régulo de plomo, esperar hasta que el plomo se funda y se absorba la copela, liberando de esa manera el botón o doré (oro + plata).
- Dar pequeños golpes al doré para laminarlo y colocarlo en un vaso de precipitación.
- En el vaso que contiene la lámina se agrega ácido nítrico concentrado para calentar durante 10 minutos (se obtiene el botón de oro).
- Lavar de tres a cuatro veces con agua el botón de oro.
- Agregar 3 mL de agua regia (Ácido clorhídrico + Ácido Nítrico 3:1)
- Aforar la solución con ácido clorhídrico (HCL) al 10% en una probeta de 25mL.
- Realizar la lectura de oro en el espectrofotómetro de absorción atómica.

Tabla 3.1. Tipo de mineral y tipo de oxidante o reductor.

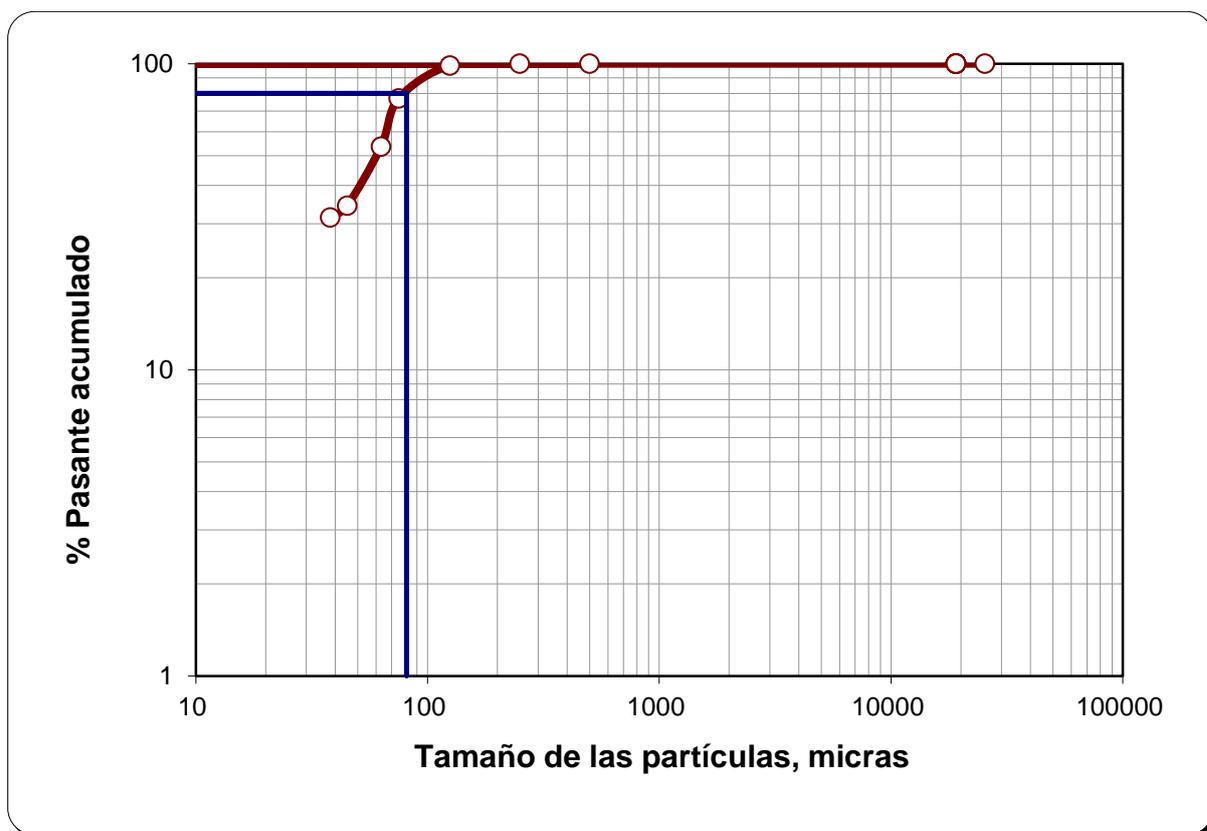
MUESTRA	COLOR	CANTIDAD (g)	CANT. HARINA (g)
Cabeza	gris	25	1.5 - 2
Concentrado	negro	10	3
Colas	blanco	30	15 g (Nitro)

Tabla 3.2. Carga fundente.

COMPOSICION DE LA CARGA FUNDENTE	
Litargirio (PbO)	1650 g
Carbonato de sodio	750 g
Bórax	500 g
Sílice	50 g

Elaborado por: Gabriela González

ANEXO 4.- ANÁLISIS GRANULOMÉTRICO



N° malla “	Abertura de la malla (µm)	Peso parcial	% retenido	%retenido acumulado	% pasante acumulado
10	2000	0	0	0	100
18	1000	0	0	0	100
35	500	0.02	0.01	0.01	99.99
60	250	0.03	0.02	0.02	99.97
120	125	3.42	1.41	1.43	98.57
200	75	52.45	21.58	23.01	77.00
230	63	56.82	23.37	46.38	53.62
325	45	46.74	19.23	65.61	34.39
400	38	7.10	2.92	68.53	31.47
-400	LAMAS	76.50	31.47	100.00	0.000
TOTAL		243.08	100		

D80= 81 µm

Elaborado por: Gabriela González

ANEXO 5.- DETERMINACIÓN DE IÓN FERROSO (Fe^{2+}), HIERRO TOTAL (González, 1999; Muir y Andersen, 1997)

PROCEDIMIENTO IÓN FERROSO (Fe^{2+})

- La muestra (0.1mL), en el rango de 10 –100 ppm de Fe^{2+} , se coloca en un tubo de 10 mL. Previamente, la muestra se diluye con agua destilada para que la concentración de Fe^{2+} este dentro del rango señalado.
- Se añade reactivo fluoruro complejante (1.0 mL), seguido por agitación del tubo por 2 minutos.
- Se añade 0.4 mL del reactivo ortofenantrolina y el tubo se agita vigorosamente por 2 minutos.
- La mezcla se diluye a 2.5 mL con agua destilada acidulada (pH 1.8) y el tubo se agita nuevamente.
- Después de 5 minutos y a temperatura ambiente se lee la absorbancia en UV visible a 510 nm.

PROCEDIMIENTO HIERRO TOTAL

- La muestra (0.1mL), en el rango de 10 –100 ppm de Fe Total se coloca en un tubo de 10 mL. Previamente, la muestra se diluye con agua destilada para que la concentración de Fe Total este dentro del rango señalado.
- Se agrega 0.1 mL de Agente reductor (Clorhidrato de Hidroxilamina al 10%) y se agita fuertemente durante 3 minutos aproximadamente.
- Se añade 0.4 mL del reactivo ortofenantrolina y el tubo se agita vigorosamente por 2 minutos.
- La mezcla se diluye a 2.5 mL con agua destilada acidulada (pH 1.8) y el tubo se agita nuevamente.
- Después de 5 minutos y a temperatura ambiente se lee la absorbancia en UV visible a 510 nm

El blanco contiene todos los reactivos excepto la muestra, la cual se reemplaza por agua destilada. Para la curva de calibrado se realizó soluciones estándares de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en un rango de 10 a 100 ppm. Estas soluciones se procesan y se leen de manera idéntica a la solución problema.

ANEXO 6.- DETERMINACIÓN DE SULFATOS (González, 1999)

PROCEDIMIENTO

- Tomar una muestra y realizar un factor de dilución a un aforo de 2mL
- Colocar la muestra diluida en un tubo de ensayo y añadir 0.1 mL de reactivo condicionante.
- Agitar continuamente durante 3 minutos.
- Añadir cloruro de bario con la ayuda de una espátula y agitar por un minuto.
- Medir absorbancia a 520 nm durante 4 minutos, tomando como el valor máximo.
- Se toma como blanco a una muestra que no se añade cloruro de bario.
- Para la curva de calibrado se realizó soluciones estándares de Na_2SO_4 anhidro en un rango de 10 a 100 ppm. Estas soluciones se procesan y se leen de manera idéntica a la solución problema.

ANEXO 7.- CONTEO CÁMARA NEUBAUER

Se tomó aproximadamente 10 μL de muestra la cual se la colocó entre la cámara y el cubre objeto, esto fue observado en el microscopio con lente de 100X, en la siguiente figura (Figura 7.1) se puede observar que a partir del cuadrante central el conteo celular se realiza en diagonal por los cuadrantes 1, 2, 3, 4 y 5.

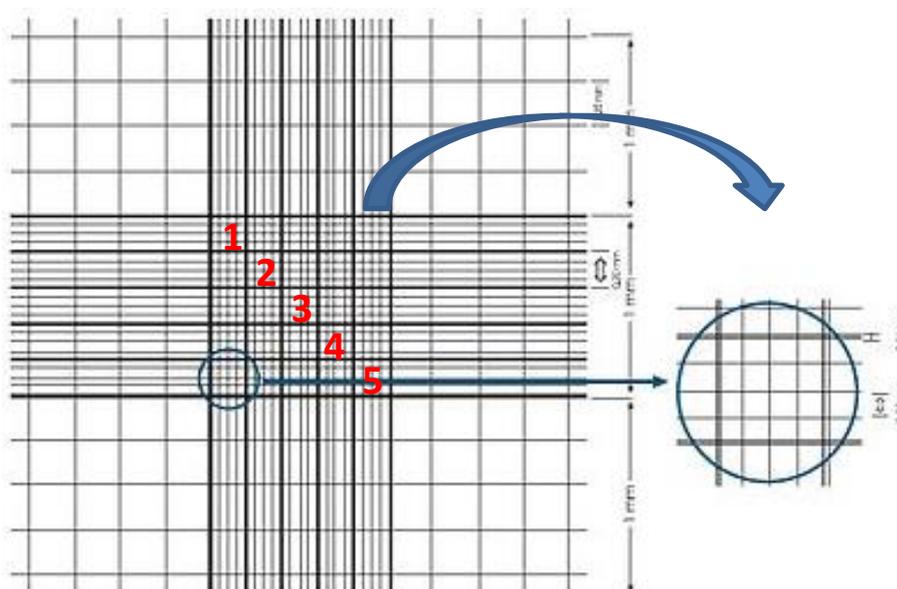


Figura 7.1 Cámara Neubauer
Elaborado por: Gabriela González

Se realizó el conteo de células con ayuda de una cámara de Neubauer. Para determinar el número de bacterias por mL fue necesario aplicar la siguiente ecuación:

$$\frac{\#bac}{ml} = \frac{4 \cdot 10^6 * FD * \#bac \cdot contadas}{20}$$

ANEXO 8.- PROCEDIMIENTO DE CIANURACIÓN (Gonzaga, 2005; Jaramillo, 2014; Ludeña, 2012)

Para realizar la cianuración se siguió el siguiente procedimiento:

El protocolo que se siguió para cianurar fue el siguiente:

- Preparación de la pulpa con la cantidad de material y agua dado en la Tabla 8.1 dependiendo de la muestra.
- Homogenización de la pulpa en la celda de cianuración por 5 minutos.
- Medición del pH y adición de cal para alcanzar el pH de operación (10.5 - 11).
- Adición de cianuro de sodio según las concentraciones establecidas. Desde el momento que empieza la prueba de cianuración hasta 11 horas.
- Filtración al vacío de la pulpa para obtener la torta y la solución.
- La torta se coloca en la estufa para eliminar la humedad.
- La torta seca se disgrega, homogeniza y almacena para su análisis químico junto con la solución cianurada

Control de Cianuro libre y pH

La determinación del cianuro libre se realizó por viraje con solución de nitrato de plata a 4.34 g/L, para esto se tomó una alícuota de 25 mL de pulpa que se filtró al vacío para separar los sólidos, del filtrado se tomó 5 mL en un vaso de precipitación agregando 4 gotas de indicador (yoduro de potasio) y se llevó a titulación con una solución de Nitrato de plata (AgNO_3). El momento del viraje se produce cuando la solución cambia de transparente a ligeramente amarillo, se toma lectura del gasto de nitrato de plata y se calcula el cianuro libre con la siguiente ecuación:

$$\text{NaCN}_{\text{libre}} = \frac{\text{Factor}_{\text{titulación}} * \text{Volumen}_{\text{titulación}}(\text{ml})}{V_{\text{solución problema}}(\text{ml})}$$

La cantidad de cianuro que se ha consumido es igual a la concentración de NaCN inicial menos el cianuro libre residual, este valor es el que debe ser adicionado para mantener la concentración inicial. En el momento de detener el proceso se tituló el cianuro libre residual, que es el cianuro remanente en la pulpa. Los controles se programaron cada hora.

Tabla 8.1. Condiciones de operación para la cianuración de mineral biooxidado.

Parámetros	Cantidad	Unidades
Dilución S/L	½	-
Peso material	100	g
Volumen de agua	200	mL
pH	10.5-11	-
Concentración CN	1	g/L
Tiempo de cianuración	24	horas

Elaborado por: Gabriela González

ANEXO 9.- COMPARACIÓN MÚLTIPLE PARA LA VARIABLE DE RESPUESTA Qp Fe³⁺ (g/L día) RESPECTO A LA DENSIDAD DE PULPA

	(% p/v)	(% p/v)	Diferencia de medias	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Scheffé	5	10	,66667*	,04889	,000	,4959	,8374
		15	1,50800*	,04889	,000	1,3373	1,6787
		20	1,52767*	,04889	,000	1,3569	1,6984
	10	5	-,66667*	,04889	,000	-,8374	-,4959
		15	,84133*	,04889	,000	,6706	1,0121
		20	,86100*	,04889	,000	,6903	1,0317
	15	5	-1,50800*	,04889	,000	-1,6787	-1,3373
		10	-,84133*	,04889	,000	-1,0121	-,6706
		20	,01967	,04889	,982	-,1511	,1904
	20	5	-1,52767*	,04889	,000	-1,6984	-1,3569
		10	-,86100*	,04889	,000	-1,0317	-,6903
		15	-,01967	,04889	,982	-,1904	,1511
DMS	5	10	,66667*	,04889	,000	,5539	,7794
		15	1,50800*	,04889	,000	1,3953	1,6207
		20	1,52767*	,04889	,000	1,4149	1,6404
	10	5	-,66667*	,04889	,000	-,7794	-,5539
		15	,84133*	,04889	,000	,7286	,9541
		20	,86100*	,04889	,000	,7483	,9737
	15	5	-1,50800*	,04889	,000	-1,6207	-1,3953
		10	-,84133*	,04889	,000	-,9541	-,7286
		20	,01967	,04889	,698	-,0931	,1324
	20	5	-1,52767*	,04889	,000	-1,6404	-1,4149
		10	-,86100*	,04889	,000	-,9737	-,7483
		15	-,01967	,04889	,698	-,1324	,0931
Games-Howell	5	10	,66667*	,06421	,002	,3957	,9376
		15	1,50800*	,04307	,000	1,2935	1,7225
		20	1,52767*	,04267	,000	1,3107	1,7446
	10	5	-,66667*	,06421	,002	-,9376	-,3957
		15	,84133*	,05439	,004	,5410	1,1417
		20	,86100*	,05408	,004	,5572	1,1648
	15	5	-1,50800*	,04307	,000	-1,7225	-1,2935
		10	-,84133*	,05439	,004	-1,1417	-,5410
		20	,01967	,02563	,866	-,0848	,1241
	20	5	-1,52767*	,04267	,000	-1,7446	-1,3107
		10	-,86100*	,05408	,004	-1,1648	-,5572
		15	-,01967	,02563	,866	-,1241	,0848
C de Dunnett	5	10	,66667*	,06421		,2218	1,1115
		15	1,50800*	,04307		1,2096	1,8064
		20	1,52767*	,04267		1,2320	1,8233
	10	5	-,66667*	,06421		-1,1115	-,2218
		15	,84133*	,05439		,4645	1,2182
		20	,86100*	,05408		,4863	1,2357
	15	5	-1,50800*	,04307		-1,8064	-1,2096
		10	-,84133*	,05439		-1,2182	-,4645
		20	,01967	,02563		-,1579	,1972
	20	5	-1,52767*	,04267		-1,8233	-1,2320
		10	-,86100*	,05408		-1,2357	-,4863
		15	-,01967	,02563		-,1972	,1579

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

ANEXO 10.- COMPARACIÓN MÚLTIPLE PARA LA VARIABLE DE RESPUESTA Qp SO₄²⁻ RESPECTO A LA DENSIDAD DE PULPA

	% (p/v)	% (p/v)	Diferencia de medias	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Scheffé	5	10	1,00700	,13176	,000	,5468	1,4672
		15	1,16900	,13176	,000	,7088	1,6292
		20	1,54533	,13176	,000	1,0851	2,0055
	10	5	-1,00700	,13176	,000	-1,4672	-,5468
		15	,16200	,13176	,690	-,2982	,6222
		20	,53833	,13176	,023	,0781	,9985
	15	5	-1,16900	,13176	,000	-1,6292	-,7088
		10	-,16200	,13176	,690	-,6222	,2982
		20	,37633	,13176	,115	-,0839	,8365
	20	5	-1,54533	,13176	,000	-2,0055	-1,0851
		10	-,53833	,13176	,023	-,9985	-,0781
		15	-,37633	,13176	,115	-,8365	,0839
DMS	5	10	1,00700	,13176	,000	,7032	1,3108
		15	1,16900	,13176	,000	,8652	1,4728
		20	1,54533	,13176	,000	1,2415	1,8492
	10	5	-1,00700	,13176	,000	-1,3108	-,7032
		15	,16200	,13176	,254	-,1418	,4658
		20	,53833	,13176	,004	,2345	,8422
	15	5	-1,16900	,13176	,000	-1,4728	-,8652
		10	-,16200	,13176	,254	-,4658	,1418
		20	,37633	,13176	,021	,0725	,6802
	20	5	-1,54533	,13176	,000	-1,8492	-1,2415
		10	-,53833	,13176	,004	-,8422	-,2345
		15	-,37633	,13176	,021	-,6802	-,0725
Games-Howell	5	10	1,00700	,11983	,004	,5139	1,5001
		15	1,16900	,11975	,002	,6763	1,6617
		20	1,54533	,13515	,002	,9643	2,1264
	10	5	-1,00700	,11983	,004	-1,5001	-,5139
		15	,16200	,12829	,627	-,3603	,6843
		20	,53833	,14277	,067	-,0536	1,1303
	15	5	-1,16900	,11975	,002	-1,6617	-,6763
		10	-,16200	,12829	,627	-,6843	,3603
		20	,37633	,14271	,179	-,2155	,9681
	20	5	-1,54533	,13515	,002	-2,1264	-,9643
		10	-,53833	,14277	,067	-1,1303	,0536
		15	-,37633	,14271	,179	-,9681	,2155
C de Dunnett	5	10	1,00700	,11983		,1768	1,8372
		15	1,16900	,11975		,3393	1,9987
		20	1,54533	,13515		,6090	2,4817
	10	5	-1,00700	,11983		-1,8372	-,1768
		15	,16200	,12829		-,7268	1,0508
		20	,53833	,14277		-,4508	1,5275
	15	5	-1,16900	,11975		-1,9987	-,3393
		10	-,16200	,12829		-1,0508	,7268
		20	,37633	,14271		-,6124	1,3650
	20	5	-1,54533	,13515		-2,4817	-,6090
		10	-,53833	,14277		-1,5275	,4508
		15	-,37633	,14271		-1,3650	,6124

La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

ANEXO 11.- FOTOS

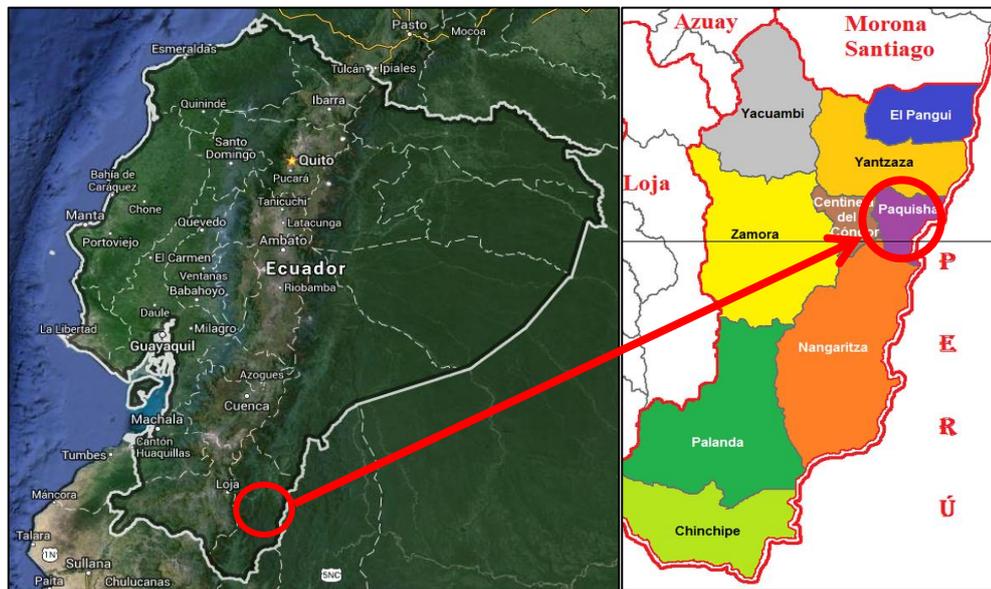


Figura 11.1. Ubicación del yacimiento minero San Vicente

Elaborado por: Gabriela González



Figura 11.2. Yacimiento minero San Vicente

Elaborado por: Gabriela González



Figura 11.3. Sitio de muestreo de drenajes ácidos para el aislamiento de microorganismos.
Elaborado por: Gabriela González



Figura 11.4. Muestreo del mineral aurífero para el proceso de biooxidación.
Elaborado por: Gabriela González



Figura. 11.5. Adaptación y oxidación de las cepas microbianas.
Elaborado por: Gabriela González



Figura. 11.6. Concentración en mesa vibratoria del mineral aurífero refractario.
Elaborado por: Gabriela González



Figura. 11.7. Cuateo y Homogeinización del mineral aurífero.
Elaborado por: Gabriela González



Figura. 11.8. Reactores utilizados en el proceso de biooxidación.
Elaborado por: Gabriela González

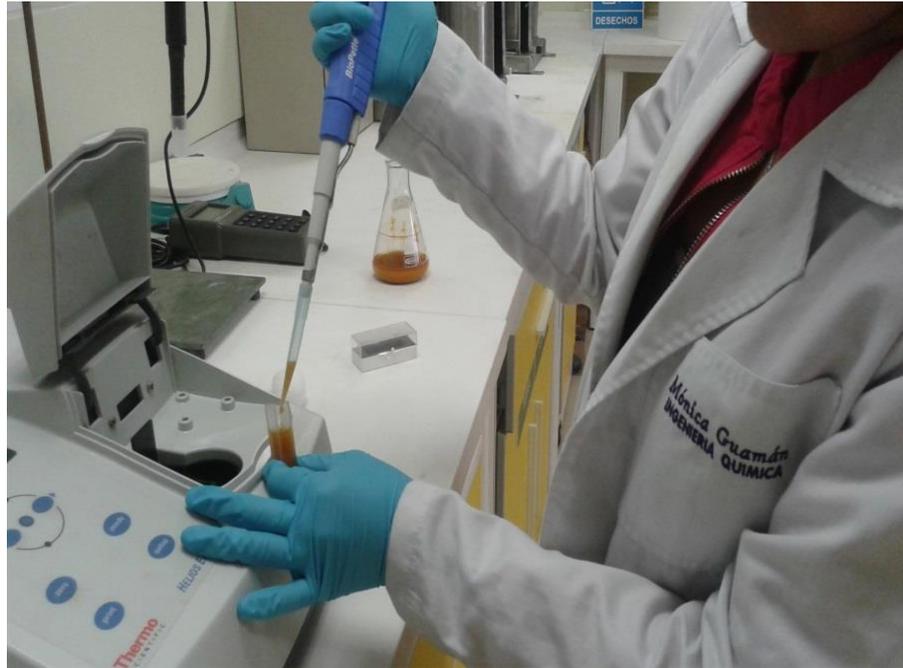


Figura. 11.9. Espectrofotómetro de UV-visible para las determinaciones analíticas durante el aislamiento y proceso de biooxidación.

Elaborado por: Gabriela González



Figura. 11.10. Cianuración del mineral biooxidado (equipo de jarras)

Elaborado por: Gabriela González

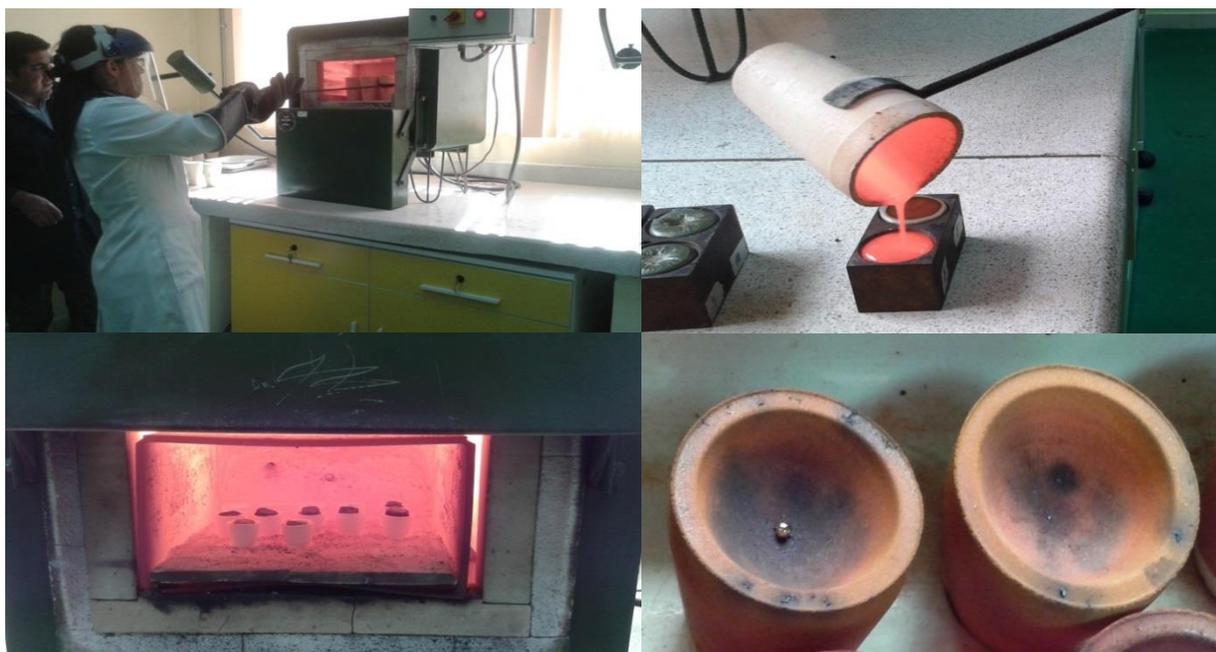


Figura. 11.11. Fundición y copelación del mineral biooxidado y del relave de cianuración.

Elaborado por: Gabriela González



Figura. 11.12. Espectrofotometría de absorción atómica para la determinación de oro.

Elaborado por: Gabriela González